

# **NMR-spektroskopische Charakterisierung der Konformere der Kalziumbindungsdomäne des Kationenkanals Polycystin-2 bei normalem und hohen hydrostatischen Drücken sowie Untersuchung seiner Interaktion mit dem Formin mDia1**

**DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
Markus Landgraf  
aus Regensburg

Februar 2018

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Gernot Längst

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Christine Ziegler

Drittprüfer: Prof. Dr. Wolfram Gronwald

---

Markus Landgraf

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
Zusammenfassung:.....	4
Abstract: .....	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) .....	8
1.1.1 Genetik und Krankheitsbild .....	8
1.1.2 Manifestation in den Organen .....	8
1.1.3 Mechanismen der Zystenbildung .....	9
1.1.4 Therapeutische Maßnahmen und Forschungsansätze .....	10
1.2 Einteilung und Namensherkunft der Polycystine .....	10
1.3 Polycystin-2 (PC2) .....	12
1.3.1 Eigenschaften .....	12
1.3.2 Expressionsorte .....	12
1.3.3 Funktionsarten von PC2 .....	12
1.3.4 Elektronenmikroskopie-Strukturen von PC2 .....	17
1.4 Interaktionspartner von PC2 .....	19
1.4.1 Das Formin Mammalian Diaphanous Homolog 1 (mDia1) .....	19
1.4.2 Weitere Interaktionspartner von PC2 .....	23
1.5 Vorstellung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine .....	29
1.5.1 Der zytosolische C-Terminus von PC2 .....	29
1.5.2 mDia1(69-451) .....	33
2 Materialien und Geräte .....	35
2.1 Bakterienstämme .....	35
2.2 Nährmedien .....	35
2.2.1 LB (Lysogeny Broth)-Medium 1L (autoklaviert) (Bertani, 1951) .....	35
2.2.2 NMM (New Minimal Medium) 1 L (steril filtriert) (Budisa et al., 1995) .....	35
2.3 Antibiotika .....	37
2.4 Chemikalien .....	37
2.5 Pufferlösungen .....	37
2.5.1 Pufferlösungen für PC2(720-797), PC2(680-796), PC2(717-792) .....	37
2.5.2 Pufferlösungen für mDia1(69-451) .....	38
2.5.3 Pufferlösungen für TEV-Protease: .....	38
2.6 Gele .....	38
2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970) .....	38

2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schagger (Schagger, 1987)	39
2.7	Enzyme	39
2.8	Proteinstandard	39
2.9	Säulenmaterialien	40
2.10	Molekularbiologische Kits	40
2.11	Verbrauchsmaterialien	40
2.12	Geräte	41
2.13	Software	42
2.14	Online-Tools	42
3	Methoden	43
3.1	Expression der Proteine	43
3.1.1	Expression von ungelabeltem PC2(680-796), PC2(717-792), PC2 (720-797)	43
3.1.2	Expression der <sup>15</sup> N-gelabelten PC2-Fragmente	43
3.1.3	Expression der TEV-Protease	44
3.1.4	Expression von mDia1	44
3.2	Reinigung der Proteine	44
3.2.1	Reinigung von PC2(680-796) und PC2(720-797)	44
3.2.2	Reinigung von PC2(717-792)	45
3.2.3	Reinigung von mDia1(69-451)	45
3.2.4	Reinigung der TEV-Protease	46
3.2.5	Dialyse von Proteinen	46
3.3	Molekularbiologische Methoden	47
3.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA	47
3.3.2	Transformation von Plasmid-DNA und Herstellung der Glycerinkulturen	47
3.4	Proteinbiochemische Methoden	47
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels UV-Absorption	47
3.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli	48
3.4.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schagger	48
3.5	Kernspinresonanzspektroskopie	48
3.5.1	Probenpräparation	48
3.5.2	Lyophilisieren und D <sub>2</sub> O-Austausch	48
3.5.3	pH-Titrationsen von PC2	49
3.5.4	CaCl <sub>2</sub> -Titrationsen von PC2	50
3.5.5	Diffusionsmessungen an PC2	54
3.5.6	Titrationsen von PC2 mit dem Formin mDia1	57



3.5.7	NMR-spektroskopische Untersuchungen an $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck .....	59
3.5.8	Überprüfung der Aromatenzuordnung von PC2(680-796) .....	62
3.5.9	Eichung der $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren.....	62
3.5.10	Konzentrationsbestimmung mit NMR.....	62
3.5.11	Berechnung der theoretischen molaren Massen der Proteine.....	62
3.5.12	Pulsprogramme Zusammenfassung .....	62
4	Ergebnisse.....	64
4.1	PC2(680-796).....	64
4.1.1	Der Aromatenbereich von PC2(680-796): Identifizierung verschiedener Zustände .....	64
4.1.2	Diffusionsmessungen an PC2(680-796).....	69
4.1.3	Interaktion von PC2(680-796) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$ .....	70
4.1.4	Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste in Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen .	79
4.1.5	Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste in Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen .	87
4.1.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der Titrationsen von PC2(680-796) .....	91
4.2	NMR-spektroskopische Untersuchungen von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck .....	92
4.2.1	Aggregationszustand und relative hydrodynamische Radii von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck .....	93
4.2.2	Kalziumfreisetzung an $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck .....	95
4.2.3	Chemische Verschiebungsänderungen in den $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bei $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck.....	99
4.2.4	Unterschiede der freien Enthalpien und partiellen Volumina .....	103
4.2.5	Relative Diffusionskonstanten der drei Zustände von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) .....	104
4.2.6	Volumenänderungen der Signale von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) im HSQC-Spektrum bei 40 MPa im Vergleich zum Ausgangsspektrum bei 1 MPa .....	106
4.3	Interaktion verschiedener Fragmente von PC2 mit dem Formin mDia1(69-451).....	108
4.3.1	Interaktion von $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) mit dem Formin mDia1(69-451) .....	108
4.3.2	Interaktion von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) mit dem Formin mDia1(69-451) .....	122
4.4	PC2(720-797).....	132
4.4.1	Interaktion von PC2(720-797) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$ .....	132
4.4.2	Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(720-797) .....	136
4.4.3	Aggregationszustand von PC2(720-797) .....	140
5	Diskussion.....	144
5.1	PC2(680-796).....	144
5.1.1	Der Aromatenbereich von PC2(680-796): Identifizierung verschiedener Zustände ...	144
5.1.2	Interaktion von PC2(680-796) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$ und Aggregatzustand .....	144

5.1.3	Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste in An- und Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$ .....	149
5.2	NMR-spektroskopische Untersuchungen an $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck .....	151
5.2.1	Proteinzustand und Kalziumfreisetzung.....	151
5.2.2	3-Zustandsmodell und Diffusionsmessungen .....	151
5.2.3	Potentielle Interaktionsflächen im Homodimer von PC2(717-792).....	153
5.3	Interaktion verschiedener Fragmente von PC2 mit dem Formin mDia1(69-451).....	156
5.3.1	Interaktion von PC2(680-796) mit dem Formin mDia1(69-451) .....	156
5.3.2	Interaktion von PC2(717-792) mit dem Formin mDia1(69-451) .....	157
5.3.3	Vergleich der Interaktionen von PC2(680-796) und PC2(717-792) mit dem Formin mDia1(69-451).....	157
5.4	PC2(720-797).....	159
5.4.1	Interaktion von PC2(720-797) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$ .....	159
5.4.2	Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(720-797) .....	159
5.4.3	Aggregationszustand von PC2(720-797) .....	160
6	Anhang.....	161
6.1	Abbildungsverzeichnis .....	161
6.2	Tabellenverzeichnis .....	166
6.3	Literaturverzeichnis:.....	169
6.4	Chemische Verschiebungen: .....	179
7	Danksagung .....	206
8	Eidesstattliche Erklärung .....	207

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1D</b>	eindimensional
<b>2D</b>	zweidimensional
<b>3D</b>	dreidimensional
<b>A</b>	Alanin
<b>ADPKD</b>	Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung
<b>AEBSF</b>	4-Benzensulfonylfluorid
<b>APS</b>	Ammoniumperoxosulfid
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>BP</b>	Bindungsplatz
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>c</b>	Konzentration
<b>C</b>	Cystein
<b>CD</b>	Circulardichroismus
<b>C-Terminus</b>	Carboxy-terminales Ende
<b>D</b>	Aspartat
<b>D</b>	Diffusionskoeffizient
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Deuteriumoxid
<b>Da</b>	Dalton
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DSS</b>	2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonsäure
<b>DTE</b>	1,4-Dithioerythol
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E</b>	Glutamat
<b>E. coli</b>	Escherichia coli
<b>EM</b>	exponentieller Filter
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>F</b>	Phenylalanin
<b>F1</b>	Frequenz axis 1
<b>F2</b>	Frequenz axis 2
<b>g</b>	Gramm
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>G</b>	Glycin
<b>GAP</b>	GTPase-activating protein
<b>GB</b>	Gaussian max. position for GM, $0 < GB < 1$
<b>GDP</b>	Guanosin-5'-diphosphat
<b>GEF</b>	Guanosin nucleotide exchange factor
<b>GM</b>	Gaußfilter
<b>GppNHp</b>	Guanosin-5'-(beta, gamma-imido) triphosphat
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>GTP</b>	Guanosin-5'-triphosphat

<b>GTPase</b>	GTP hydrolysierendes Enzym
<b>h</b>	Stunde
<b>H</b>	Histidin
<b>D<sub>HDO</sub></b>	Diffusionskoeffizient
<b>HPLC</b>	high performance liquid chromatography
<b>HSQC</b>	Heteronuclear single quantum coherence
<b>I</b>	Isoleucin
<b>ITC</b>	isotherme Titrationskalorimetrie
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
<b>K</b>	Lysin
<b>K</b>	Kelvin
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>K<sub>a</sub></b>	Boltzmann Konstante
<b>K<sub>D</sub></b>	Dissoziationskonstante
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Liter
<b>L</b>	Leucin
<b>LB</b>	Lysogeny Broth-Medium
<b>LB</b>	Linienbreite
<b>M</b>	Methionin
<b>MDia1</b>	Mammalian Diaphanous Homolog 1
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>N</b>	Asparagin
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Natriumazid
<b>NTA</b>	Nitrilotriessigsäure
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NMM</b>	New Minimal Medium
<b>NMR</b>	nuclear magnetic resonance
<b>NOESY</b>	Nuclear Overhauser Effekt Spectroscopy
<b>NS</b>	Number of scans
<b>N-Terminus</b>	Amino-terminales Ende
<b>OD<sub>600</sub></b>	Optische Dichte bei 600 nm
<b>P</b>	Prolin
<b>PAA</b>	Polyacrylamid
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PC1</b>	Polycystin-1
<b>PC2</b>	Transient receptor potential channel Polycystin-2
<b>PDB</b>	Protein data bank

<b>pH</b>	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
<b>pK</b>	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstanten
<b>PKD1</b>	Gen, das für Polycystin-1 kodiert
<b>PKD2</b>	Gen, das für Polycystin-2 kodiert
<b>ppm</b>	parts per milion
<b>Q</b>	Glutamin
<b>R</b>	Arginin
<b>R<sub>H</sub></b>	hydrodynamischer Radius
<b>Rho A</b>	Ras homologue A
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s</b>	Sekunde
<b>S</b>	Serin
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SEC</b>	Size exclusion chromatography
<b>SF</b>	Spektrometerfrequenz
<b>SI</b>	Size of real Spectrum
<b>sog.</b>	Sogenannte
<b>T</b>	Threonin
<b>T</b>	Temperatur
<b>Tag</b>	Affinitatsanhang
<b>TD</b>	Time domain
<b>TEV</b>	Protease Cystein Protease aus dem Tobacco Etch Virus
<b>TOCSY</b>	Total Correlation Spectroscopy
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TROSY</b>	Transverse relaxation optimized spectroscopy
<b>U</b>	Unit
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>ü. N.</b>	über Nacht
<b>V</b>	Volt
<b>V</b>	Volumen
<b>V</b>	Valin
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>W</b>	Tryptophan
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>w/v</b>	Masse pro Volumen
<b>Y</b>	Tyrosin
<b>zgpw5</b>	1D with w5 water suppression
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μM</b>	Mikromolar
<b>η</b>	dynamische Viskosität

## Zusammenfassung:

Der nichtselektive Kationenkanal Polycystin-2 (PC2) ist das Genprodukt von PKD2, einem von zwei Genen, deren Mutation die Krankheit ADPKD, die am weitesten verbreitete monogenetische Erbkrankheit mit Todesfolge, bedingt. Der zytosolische C-Terminus von PC2 enthält zwei EF-Hand-Motive und vollzieht eine Konformationsänderung bei Kalziumbindung. Er interagiert außerdem mit einer Reihe von Proteinen, die an der Regulation der Kanalaktivität entscheidend beteiligt sind. Vieles deutet darauf hin, dass die verschiedenen Konformere des C-Terminus sowohl eine entscheidende Rolle bei der Kalziumbindung als auch der Interaktion von PC2 mit Zielproteinen spielen. Ziel dieser Arbeit war es, mit NMR-spektroskopischen Methoden verschiedene Konformere des C-Terminus von PC2 zu identifizieren und Einblick in ihre Funktion zu gewinnen.

Aufgenommene  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY- und 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren zeigen zwei Zustände für PC2(680-796) in einem Verhältnis von ca. 60 (Zustand A) : 40 (Zustand B) an. Zustand B von PC2(680-796) weist mit einem  $K_D$ -Wert im Bereich von 10  $\mu\text{M}$  eine deutlich höhere Affinität für Kalziumionen auf als Zustand A, bei dem die Kalziumaffinität mit einem  $K_D$ -Wert von ca. 137  $\mu\text{M}$  um mindestens das zehnfache herabgesetzt ist. Es wurde außerdem ein dritter unbekannter kalziumabhängiger Prozess mit einem  $K_D$ -Wert von ungefähr 612  $\mu\text{M}$  identifiziert, der aber auch auf einen Ionenstärkeeffekt zurückzuführen sein könnte. Die durchgeführten Diffusionsmessungen zeigen für das Fragment PC2(680-796) mit  $32048 \pm 2527$  g/mol eine scheinbare Molekülmasse etwas oberhalb eines Dimers an. Sehr wahrscheinlich stellt dieser Wert die Mischung eines Gleichgewichts von mono-, di- und tetrameren Zuständen von PC2(680-796) dar. Ein Strukturhomologieabgleich mit dem bekannten EF-Hand-Protein Calmodulin zeigte, dass die verwendeten Markersignale nicht in der potentiellen Interaktionsfläche eines PC2-Dimers liegen. Daher ist zu vermuten, dass das 60 : 40 Verhältnis kein Polymergleichgewicht widerspiegelt. Fragmente, denen der  $\alpha$ -helikale Bereich vor der atypischen EF-Hand 1 fehlt, zeigten in früheren Studien bereits relativ geringe Kalziumaffinitäten. Das Fragment PC2(680-796) enthält eben diesen  $\alpha$ -helikalen Bereich vor EF-Hand 1. Das lässt den Schluss zu, dass nur bei 40 % (Zustand B) von PC2(680-796) der  $\alpha$ -helikale Bereich und damit wahrscheinlich EF-Hand 1 korrekt ausgebildet ist, was in hohen Affinitäten für Kalziumionen resultiert. Die korrekte Ausbildung dieses Bereichs kann von vielen Faktoren abhängen. Dies stellt auch einen möglichen Regulationsmechanismus im Hinblick auf die Kalziumaffinität des C-Terminus von PC2 dar.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mittels NMR-spektroskopischer Methoden die Interaktion des zytosolischen C-Terminus von PC2 mit dem Formin mDia1 zu untersuchen und die Binderegionen auf der 3D-Struktur zu definieren. Die Erkenntnisse aus den Interaktionsstudien sollten zu einem besseren Verständnis der Verbindungen von PC2 zum Aktinzytoskelett und der Steuerung der Kanalaktivität beitragen und dadurch auch einen möglichen Mechanismus der Zystenbildung aufzeigen. Für die Interaktionsstudien wurden die Fragmente PC2(680-796) und PC2(717-792) gewählt, von denen nur ersteres die  $\alpha$ -helikalen Bereiche vor der atypischen EF-Hand 1 aufweist. Für PC2(680-796) wurde das bereits aus den Kalziumexperimenten bekannte ungefähre 60 (Zustand A) : 40 (Zustand B)-Verhältnis in den HSQC-Spektren bestätigt. Bei Zugabe von mDia1 zeigen Aminosäuren des Zustands B von PC2(680-796) die stärksten Änderungen. Es wurde ein mittlerer  $K_D$ -Wert von  $43 \pm 20$   $\mu\text{M}$  für die Interaktion des Zustands B mit mDia1 errechnet. Zustand A besitzt eine deutlich schwächere Affinität für mDia1. Die Ergebnisse deuten auf keine Unterschiede bei den Interaktionsflächen für Zustand A bzw. B mit dem Formin mDia1 hin. Für PC2(717-792) wurde nur ein Zustand und eine schwache Affinität für mDia1 beobachtet. Auch dieses Fragment zeigt Interaktionsflächen im Bereich der EF-Hände und im Linker dazwischen. Falls, wie bereits vermutet,

nur bei 40 % (Zustand B) von PC2(680-796) der  $\alpha$ -helikale Bereich und damit wahrscheinlich EF-Hand 1 korrekt ausgebildet ist, wäre damit eine Bedingung für die mDia1-Interaktion identifiziert. Dass für Aminosäuren im  $\alpha$ -helikalen Bereich starke Effekte vor allem der Zustände B beobachtet wurden, unterstützt diese These und deutet eventuell sogar auf eine direkte Beteiligung dieses Bereichs bei der Interaktion mit mDia1 hin.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollten die verschiedenen Konformere des zytosolischen C-Terminus von PC2 anhand des Fragments PC2(717-792) identifiziert werden. Proteine liegen normalerweise in konformationellen Gleichgewichten vor. Die Populationen verschiedener Konformere des Proteins im schnellen Austausch werden im thermischen Gleichgewicht von der Differenz der freien Enthalpien  $\Delta G_{1i}^0$  bestimmt. Durch die Anwendung von Hochdruck können Konformere, die unter Normaldruck nur schwach populiert sind, stabilisiert und sichtbar gemacht werden. Es wurden Spektren für PC2(717-792) bei Druckstufen von 1 MPa bis zu 250 MPa aufgenommen. Anhand der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungsänderungen wurden  $\Delta G^0$  und  $\Delta V^0$ , die freien Enthalpien bei Normaldruck bzw. die partiellen molaren Volumen bei Normaldruck, für die zwei Übergänge im 3-Zustandsmodell im schnellen Austausch errechnet. Es ergibt sich für den Übergang von Zustand 1 zu 2 ein  $\Delta G_{12}^0$  von  $-3735 \pm 42$  J/mol und ein  $\Delta V_{12}^0$  von  $-53 \pm 18,28$  ml/mol. Für den Übergang von Zustand 1 zu 3 ergibt sich ein  $\Delta G_{13}^0$  von  $9663 \pm 25$  J/mol und ein  $\Delta V_{13}^0$  von  $-89,83 \pm 0,56$  ml/mol. Die freien Enthalpien  $\Delta G^0$  bestimmen die Populationsverhältnisse der Zustände von PC2(717-792) und zeigen damit die relativen Konzentrationen der einzelnen Zustände des Proteins bei Normaldruck an. Aufgrund des Prinzips des kleinsten Zwangs verschiebt sich bei Druckanwendung die Population immer in Richtung des Zustands mit dem kleineren partiellen molaren Volumen. Unter Normaldruck zeigen die Diffusionsmessungen mit  $16725 \pm 998$  g/mol die scheinbare Molekülmasse eines Dimers an, wie es bereits von dem Fragment PC2(680-796) unter diesen Bedingungen bekannt ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich hinter diesem Messwert eine Mischung aus Mono-, Di- und Tetrameren verbirgt. Im 3-Zustandsmodell von PC2(717-792) stellt bei Normaldruck Zustand 1 (20 %) wahrscheinlich das Tetramer, Zustand 2 (80 %) das Dimer und Zustand 3 (< 1%) das Monomer dar, wobei mit steigendem Druck der Tetrameranteil verschwindet und der Monomeranteil zunimmt. Die Kalziumfreisetzung scheint bei 160 MPa abgeschlossen zu sein. Die ermittelten Druckkoeffizienten  $B_2^*$  der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen zeigen starke konformationelle Effekte in den beiden C-terminalen Helices 3 und 4 (kanonische EF-Hand) an, während im Bereich der beiden N-terminalen Helices 1 und 2 (atypische EF-Hand) nur schwache Effekte beobachtet wurden. Dies spricht dafür, dass beim Fragment PC2(717-792), dem der  $\alpha$ -helikale Bereich vor der atypischen EF-Hand 1 fehlt, nur die kanonische EF-Hand 2 Kalzium binden kann, da sonst durch die Kalziumfreisetzung Effekte bei EF-Hand 1 zu beobachten gewesen wären. Für verkürzte Fragmente ohne  $\alpha$ -helikalen Bereich vor EF-Hand 1 wurden bereits verringerte Kalziumaffinitäten gezeigt. Es deutet somit vieles darauf hin, dass die korrekte Ausbildung der atypischen EF-Hand 1 für die Interaktion mit Kalziumionen und Proteinen wie dem Formin mDia1 essentiell ist. Bei der Ausbildung von EF-Hand 1 scheint der N-terminale  $\alpha$ -helikale Bereich eine wichtige Rolle zu spielen.

## Abstract:

Non-selective cation channel polycystin-2 (PC2) is the gene product of PKD2. PKD2 is one of two genes that cause - when mutated - ADPKD, the most prevailing hereditary disease leading to death. The cytosolic C-terminus of PC2 contains two EF-Hand motifs and undergoes conformational change at calcium binding. The C-terminus also interacts with a variety of proteins which are involved in regulation of the channel activity. There is evidence to suggest that the different conformers of the C-terminus play an important role in binding both calcium ions and target proteins. The purpose of this thesis was to identify different conformers of C-terminal PC2 with NMR-spectroscopy and to gain insight into their functions.

Recorded  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY- and 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-spectra display two states for PC2(680-796) in a ratio of 60 (state A) : 40 (state B). State B shows an approximate  $K_D = 10 \mu\text{M}$  and therefore much higher affinity for calcium ions compared to state A with an at least tenfold decreased affinity ( $K_D = 137 \mu\text{M}$ ). Another calcium-dependent process with an approximate  $K_D = 612 \mu\text{M}$  was identified, which could be attributed to ionic strength effects. Diffusion measurements show apparent molecular masses of  $32048 \pm 2527 \text{ g/mol}$  slightly above the value for a dimer of PC2(680-796). This value likely represents a mixture of mono-, di- and tetrameric states. Structural homology comparison with EF-hand protein calmodulin showed that the used marker signals do not lie in the potential interface of the PC2-Dimer. Therefore it has to be assumed that the 60 : 40 ratio does not represent the ratio of polymeric states. Fragments that are truncated and do not contain the  $\alpha$ -helical region before the atypical EF-hand 1 displayed relatively low affinities for calcium in former studies. PC2(680-796) includes the  $\alpha$ -helical region. This leads to the conclusion that only 40 % (state B) of PC2(680-796) form a correct  $\alpha$ -helical region and EF-hand 1, which leads to high affinity for calcium ions. The correct formation of this region can depend on a lot of factors and could be a potential mechanism for regulation of calcium affinity.

Another purpose of this thesis was to identify the interactions of C-terminal PC2 with the formin mDia1 and to define the interacting residues. The insights gained should lead to a better understanding concerning the connections of PC2 to the actin cytoskeleton and regulation of channel activity. C-terminal PC2(680-796) and PC2(717-792) have been chosen for the interaction studies. Only PC2(680-796) contains the  $\alpha$ -helical region before the atypical EF-hand 1. For PC2(680-796) the 60 (state A) : 40 (state B) ratio known from the calcium experiments was confirmed. When mDia1 was added to the sample, amino acids of state B displayed the major effects. An average  $K_D = 43 \pm 20 \mu\text{M}$  was calculated for the interaction of state B with mDia1. State A showed decreased affinity compared to state B. The results suggest no differences in interaction sites between state A and B. For PC2(717-792) only one state was detected that showed weak affinity for mDia1 and a  $K_D$  of about  $200 \mu\text{M}$ . This fragment also shows interaction sites in the region of the EF-hands and the linker. If, as concluded from the calcium experiments, only state B (40 %) forms a correct  $\alpha$ -helical region and EF-hand 1, a requirement for the mDia1 interaction with C-terminal PC2 would be identified. Amino acids in the  $\alpha$ -helical region show strong effects especially in their state B, therefore the  $\alpha$ -helical region could be directly involved in interaction.

Another part of this thesis was to identify different conformers of the cytosolic C-terminus of PC2 using the fragment PC2(717-792). Proteins normally exist in conformational equilibria. The populations of different conformers under fast exchange conditions are determined by the differences in the Gibbs free energies  $\Delta G_{1i}^0$ . Through application of high pressure conformers, which



are almost not present under ambient pressure, can be stabilized. For PC2(717-792) spectra at pressures ranging from 1 MPa to 250 MPa have been recorded. The Gibbs free energy  $\Delta G^0$  at ambient pressure and the partial molar volumes  $\Delta V^0$  at ambient pressure have been calculated based on the chemical shift changes in a 3-state model. For transition from state 1 to 2 a  $\Delta G_{12}^0 = -3735 \pm 42$  J/mol and a  $\Delta V_{12}^0 = -53 \pm 18,28$  ml/mol was calculated. For transition from state 1 to 3 there is a  $\Delta G_{13}^0 = 9663 \pm 25$  J/mol and a  $\Delta V_{13}^0 = -89,83 \pm 0,56$  ml/mol. The Gibbs free energies  $\Delta G^0$  determine the ratio of populations for PC2(717-792) and therefore show the relative concentrations of the states 1-3 at ambient pressure. Because of the Le Chatelier's principle the populations under pressure shift to the state with the lower partial molar volume. Under ambient pressure the diffusion measurements show the apparent molecular mass of a dimer ( $16725 \pm 998$  g/mol) as known for PC2(680-796) under these conditions. Probably, the value represents again a mixture of mono-, di-, and tetramers. In a 3-state model of PC2(717-792), state 1 (20 %) probably represents the tetramer, state 2 (80 %) the dimer and state 3 (< 1 %) the monomer. With pressure increasing the tetramer disappears and the monomer percentage rises. Calcium release seems to be completed at 160 MPa. The pressure coefficients  $B_2^*$  indicate strong conformational changes in the helices 3 and 4 (canonical EF-hand), whereas for helices 1 and 2 (atypical EF-hand) only weak effects have been detected. This leads to the conclusion that PC2(717-792) lacking the  $\alpha$ -helical region before atypical EF-hand 1 can bind calcium only in the canonical EF-hand 2. Otherwise effects resulting from the calcium release would have been measured. Truncated fragments lacking the  $\alpha$ -helical region of C-terminal PC2 displayed reduced affinity for calcium in former studies. The results in this thesis suggest that correct formation of EF-hand 1 of C-terminal PC2 is essential for the interaction with calcium ions and other proteins like the formin mDia1. The  $\alpha$ -helical region may be crucial to the formation of EF-hand 1.

# 1 Einleitung

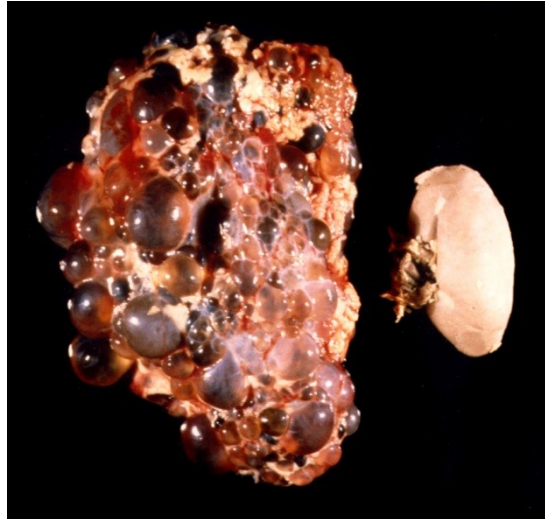
## 1.1 Die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

### 1.1.1 Genetik und Krankheitsbild

Die ADPKD ist die am weitesten verbreitete monogenetische Erbkrankheit mit Todesfolge und einer Inzidenz von 1:400 – 1:1000. *PKD1* (16p13.3) und *PKD2* (4q21) wurden als die zwei Gene identifiziert, die bei Mutation die Krankheit bedingen. *PKD1* ist in 85% der ADPKD Fälle mutiert, *PKD2* in 15%. Der Krankheitsverlauf ist bei *PKD1*-Mutationen schwerer (Harris and Torres, 2009; Mochizuki et al., 2013). Der Ausbruch der terminalen Niereninsuffizienz (ESRD: end stage renal disease) erfolgt durchschnittlich 20 Jahre eher, als bei *PKD2*-Patienten (Harris and Torres, 2009; Torres, 2014). Für die große inter- und intrafamiliäre Variabilität sind die genetische Heterogenität und sog. Modifizier-Gene verantwortlich. Es existiert ein leicht erhöhtes Risiko für an ADPKD erkrankte Männer im Vergleich zu Frauen, eine terminale Niereninsuffizienz (ESRD: end stage renal disease) zu entwickeln (Rate 1,3 : 1). Männer sterben zudem durchschnittlich eher an der Krankheit (Torres and Harris, 2009). ADPKD stellt die vierthäufigste Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz bei Erwachsenen dar (Torres, 2014). 8-10% der Nierenersatztherapien werden an Patienten mit ADPKD durchgeführt (Wanic-Kossowska et al., 2014).

### 1.1.2 Manifestation in den Organen

ADPKD wird meist erst im Erwachsenenalter diagnostiziert. Die Auswirkungen der Krankheit sind zum Großteil auf Niere (80-90%), Leber (50-90%) und Gefäßsystem beschränkt, treten aber auch weniger häufig in Pankreas (bis zu 10%), Milz (bis zu 5%), Eierstöcken, Uterus, zentralem Nervensystem und Bindegewebe auf (Harris and Torres, 2009; Wanic-Kossowska et al., 2014). ADPKD ist vor allem durch die progressive bilaterale Ausbildung renaler Zysten gekennzeichnet (Irazabal et al., 2011). Verlust oder Abnormalitäten der Zilien in den Nieren werden mit der Zystenbildung assoziiert, die bei allen Formen der PKD auftritt (Harris and Torres, 2009). Es treten Störungen der Kontrollmechanismen bei der Ausbildung der Nierentubuli sowie eine exzessive Zellproliferation und Flüssigkeitsabsonderungen auf. Zudem tragen pathogene Interaktionen von mutierten Epithelzellen mit einer abnormen extrazellulären Matrix oder aktivierte interstitielle Makrophagen zur Zystenbildung bei (Torres, 2014). Des Weiteren weisen viele Patienten abnormale extrarenale Manifestationen wie interkraniale Aneurysmen (IA) auf. Die Ruptur eines IA führt evtl. zu einer Subarachnoidalblutung mit Todesfolge. 8% der ADPKD Patienten bilden IA aus, das entspricht einem fünffach erhöhten Risiko im Vergleich zur Durchschnittbevölkerung (Irazabal et al., 2011). Die polyzystische Nierenerkrankung ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kontrolle über die Lumengröße der von den Epithelzellen gebildeten Tubuli verloren wurde (Yao et al., 2014).



**Abbildung 1: Erkrankte polyzystische Niere**

Die Abbildung wurde der Website der PKD Foundation Polycystic Kidney Disease <http://www.pkdcure.org/media/photos> entnommen und zeigt eine erkrankte polyzystische Niere (links) im Vergleich mit einer normalen gesunden Niere (rechts).

### **1.1.3 Mechanismen der Zystenbildung**

Jeder ADPKD-Patient ist Träger einer Mutation in einem Allel entweder des PKD1- oder PKD2-Gens. Die Zysten entwickeln sich jedoch nur in einem Bruchteil aller Nephrone, wobei man annimmt, dass sie durch klonales Wachstum von einzelnen Zellen in den Tubuli gebildet werden (Mochizuki et al., 2013). Die Zystenbildung beginnt, wenn die Polycystin-1 (PC1)- oder Polycystin-2 (PC2)-Level unter einen bestimmten Threshold fallen (Grantham et al., 2008). Man geht davon aus, dass eine somatische Mutation oder ungenügende Expression des Wildtyp-Allels die Zystenbildung initiieren (Mochizuki et al., 2013). Die Epithelzellen des Tubulus differenzieren nicht vollständig aus und proliferieren unablässig. Die Tubuluswand wird dabei erweitert und es bilden sich mauerartige Taschen aus, die sich ab einem Durchmesser von ca. 2 mm ablösen und zu isolierten flüssigkeitsgefüllten Zysten werden, die dann an Größe zunehmen. Aus renalen Tubuli mit einem Durchmesser von 20–40 µm bilden sich letztendlich zentimetergroße Zysten (Brasier and Henske, 1997; Grantham et al., 2008). Des Weiteren konnte im Tiermodell an Mosaikembryonen, die sowohl PKD-Wildtypzellen als auch PKD-/- Zellen enthielten, gezeigt werden, dass letztere die Wildtypzellen ersetzen, indem sie bei diesen die Apoptose induzierten (Nishio et al., 2005). Man nimmt an, dass der pathologische Prozess der Zystenvergrößerung durch zwei Faktoren bedingt wird: Erstens, gesteigerte Flüssigkeitssekretion in das Zystenlumen. Zweitens, gesteigerte Zellteilung des die Zyste auskleidenden Epithels (Mochizuki et al., 2013).

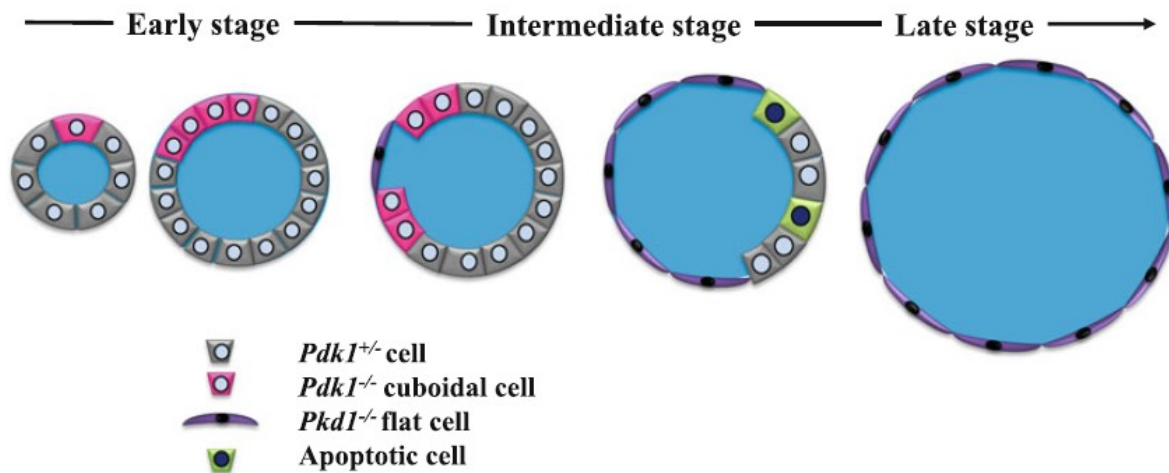


Abbildung 2: Modellschema der Zystenbildung bei ADPKD (Mochizuki et al., 2013)

#### 1.1.4 Therapeutische Maßnahmen und Forschungsansätze

Die Diagnose von ADPKD erfolgt meist anhand der Familiengeschichte und mittels Ultraschall (Mochizuki et al., 2013). Es gibt bislang keine klinisch anerkannte zielgerichtete Therapie zur Behandlung der ADPKD. Im Moment fokussiert man sich auf Blutdruckkontrolle und Behandlungen mit Statin, um die Sterblichkeit durch die Herzerkrankungen, die mit der ADPKD assoziiert sind, zu verringern (Mochizuki et al., 2013). Gentherapieansätze erscheinen aufgrund der hohen Heterogenität der ADPKD ungeeignet (Belibi and Edelstein, 2010). Medikamente, die sich im klinischen Versuchsstadium befinden, sind ACE (angiotensin-converting enzyme)-Inhibitoren, Angiotensin II Rezeptorblocker (ARBs), Vasopressinrezeptorantagonisten, Somatostatin und mTOR (mammalian target of rapamycin) – Inhibitoren (Mochizuki et al., 2013a; Torres and Harris, 2009). Triptolid (auch PG490), ein Diterpen und Hauptkomponente aus *Tripterygium wilfordii*, das antiproliferative Effekte zeigt und bereits zur Behandlung von Entzündungs- und Autoimmunkrankheiten eingesetzt wurde, konnte in Studien mit Mäusen die Zystenbildung verhindern bzw. verringern (Kiviharju et al., 2002; Leuenroth et al., 2008).

## 1.2 Einteilung und Namensherkunft der Polycystine

Der Name Polycystin bezieht sich ursprünglich auf das Genprodukt des bei Mutation ADPKD verursachenden Gens Polycystin 1 (Zhou, 2009). Polycystin-1 bzw. Polycystin-2 sind Proteine, die durch die Gene PKD1 und PKD2 kodiert werden (Yao et al., 2014). Außer den PKD1 und PKD2 Genen wurden sechs weitere Polycystine durch homology cloning identifiziert. Diese dann insgesamt acht Polycystine bilden eine Proteinfamilie. Alle Polycystine sind Transmembranproteine und weisen Homologien in ihren letzten sechs Transmembrandomänen auf (Zhou, 2009).

Die Polycystine werden auf Basis ihrer Struktur und wahrscheinlicher Funktion in zwei Unterfamilien aufgeteilt: Die erste Gruppe sind die PC1 receptor-like molecules: Zu ihnen gehören Polycystin-1, Polycystin-REJ, Polycystin-1L1 (PCL), Polycystin-1L2, und Polycystin-1L3. Die zweite Gruppe trägt den Namen Polycystin-2 ion channel-like proteins und beinhaltet die Proteine Polycystin-2 (PC2), Polycystin-L (Polycystin-2L1) und Polycystin-2L2 (vgl. Tab. 1)(Zhou, 2009). Die Ähnlichkeit der

Polycystin-2- und Polycystin-2-like-Proteine in Sequenz und Topologie zu den TRP-Kanälen (transient receptor potential channels) führte dazu, dass man sie mittlerweile als Unterfamilie der TRP-Kanal-Superfamilie einordnet, die Polycystin-2 (PC2), TRPP3 bzw. PC2-L1 und TRPP5 bzw. PC2-L2 beinhaltet (Zhou, 2009). Die TRP-Kanäle bei Säugetieren werden auf Basis ihrer Primärsequenzhomologien in sieben Gruppen eingeteilt: TRPC, TRPM, TRPP, TRPV, TRPML, TRPN, und TRPA1 (Montell, 2005). Alle TRP-Kanäle weisen sechs Transmembrandomänen auf und ihre N- und C-Termini liegen im Zytoplasma. Außer TRPV5 und TRPV6 (hochselektiv für Ca<sup>2+</sup>) und TRPM4 (undurchlässig für Ca<sup>2+</sup>) bilden alle TRP-Kanäle nichtselektive Kationenkanäle aus, die in verschiedenem Maße für divalente Kationen durchlässig sind (Owsianik et al., 2006; Tsiokas, 2009). TRP-Kanäle weisen eine höhere Diversität sowohl an Selektivitäten als auch an Aktivierungsmechanismen auf, als jede andere Gruppe von Ionenkanälen. Das wird vor allem durch ihre Fähigkeit erklärt, Heteromultimere und damit ganz neue Kanaltypen auszubilden. Alle haben gemeinsam, dass sie eine entscheidende Rolle in der Physiologie der Sensorik spielen, indem sie die einzelnen Zellen dazu befähigen, durch sie Veränderungen in ihrer lokalen Umgebung wahrzunehmen (Venkatachalam and Montell, 2007).

Protein	Gene	Chromosome locus	Expression	G protein binding/activation	Pore forming	Reference(s)
<i>PC1-like</i>						
Polycystin-1	<i>PKD1</i>	16p13.3	Widespread	+	–	43, 56, 126, 153
Polycystin-REJ	<i>PKDREJ</i>	22q13	Testis (controls the timing of fertilization)	n.d.	n.d.	154
Polycystin-1L1	<i>PKD1L1</i>	16p12–13	Relatively widespread, with higher levels in heart, testis	+	n.d.	155
Polycystin-1L2	<i>PKD1L2</i>	16q23	Relatively widespread, with higher levels in heart, testis	+	n.d.	49, 156
Polycystin-1L3	<i>PKD1L3</i>	16q22	Relatively widespread, but not in skeletal muscle	n.d.	n.d.	156
<i>PC2-like</i>						
Polycystin-2	<i>PKD2</i>	4q21–23	Widespread	n.d.	+	157, 158
Polycystin-L (Polycystin-2L1)	<i>PKDL</i> ( <i>PKD2L1</i> )	10q24–25	Relatively widespread; found in taste buds, testis	n.d.	+	29, 159
Polycystin-2L2	<i>PKD2L2</i>	5q31	Heart, testis	n.d.	n.d.	160, 161

<sup>a</sup>n.d., not determined.

Abbildung 3: Die Proteinfamilie der Polycystine (Zhou, 2009)

## **1.3 Polycystin-2 (PC2)**

### **1.3.1 Eigenschaften**

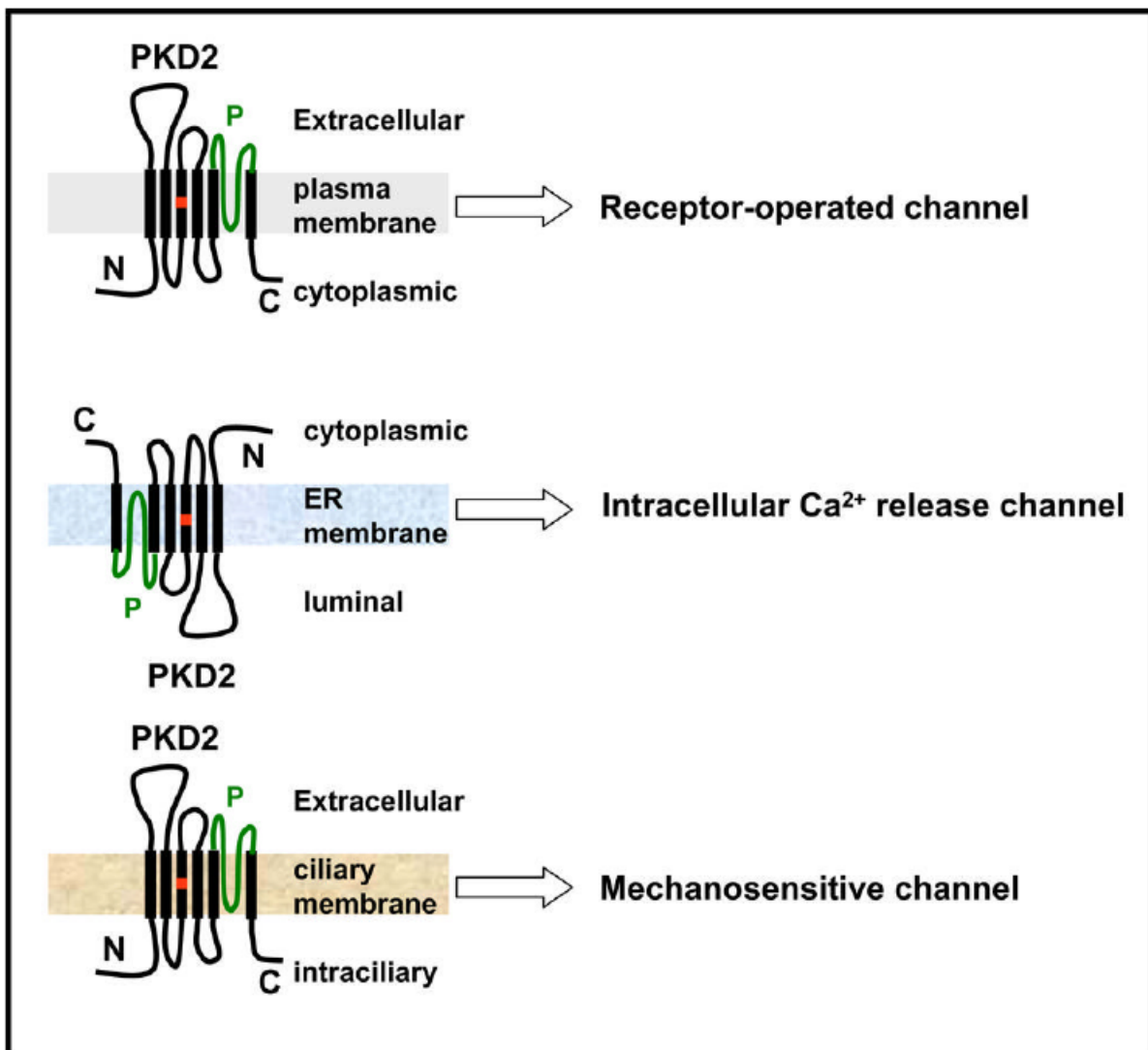
Polycystin-2 (PC2) wird von dem Gen PKD2 kodiert und ist ein 968 Aminosäuren langes integrales Membranprotein (110 kDa) mit sechs Transmembrandomänen sowie einem zytosolischen N- und C-Terminus (Cai et al., 1999; Mochizuki et al., 1996). Der N-Terminus und der C-Terminus liegen im zytoplasmatischen Kompartiment 29 und 30 (Fedeles et al., 2014). Es bildet einen unselektiven Kationenkanal aus, der für  $\text{Ca}^{2+}$  - Ionen durchlässig ist (Fedeles et al., 2014; Nilius, 2007a; Zhou, 2009). Die Transmembransegmente 2-6 sind kennzeichnend für TRP-Kanäle, wobei die porenbildende Region zwischen Segment 5 und 6 vorhergesagt wird (Rossetti et al., 2007). Für den zytosolischen C-Terminus von PC2 wurden zwei EF-Hände für AS 727-739 bzw. AS 763-774 (Mochizuki et al., 1996; Schumann et al., 2009a), zwei Coiled-Coil Domänen im Abschnitt AS 781-796 und AS 835-873 (Giamarchi et al., 2010; Mochizuki et al., 1996; Qian et al., 1997) sowie ein ER Retentionssignal im Bereich AS 787-820 identifiziert (Cai et al., 1999).

### **1.3.2 Expressionsorte**

PC2 wird in Epithelzellen der Niere, Leber, Bauchspeicheldrüse, Brust, in Muskeln, Hoden, Blutgefäßen und in Astrocyten im Gehirn exprimiert (Foggensteiner et al., 2000; Geng et al., 1996, 1997; Griffin et al., 1997; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997; Markowitz et al., 1999; Ong et al., 1999; Ward et al., 1996). Am primären Zilium findet sich PC2 am Schaft und am Basalkörper (Yoder et al., 2002; Zhou, 2009). Außerdem konnte man eine Expression im Zytoplasma und in apikalen und basolateralen Membranen der Niere sowie im Endoplasmatischen Retikulum und der Plasmamembran feststellen (Cai et al., 1999; Foggensteiner et al., 2000; Luo et al., 2003; Obermüller et al., 1999). In der Niere findet man PC2 in allen Nephronsegmenten mit Ausnahme der dünnen Schenkel der Henle-Schleife und des Glomerulus (Fedeles et al., 2014).

### **1.3.3 Funktionsarten von PC2**

PC2 kann an verschiedenen Orten in der Zelle verschiedene Funktionen einnehmen. In den primären Zilien von Nierenzellen fungiert es als mechanosensitiver Kanal und im endoplasmatischen Retikulum als intrazellulärer Kanal zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (Rundle et al., 2004). In der Plasmamembran liegt Polycystin-2 als rezeptorgesteuerter nichtselektiver Kationenkanal vor (Abbildung 4). Außerdem wurde Polycystin-2 an den mitotischen Spindeln von sich teilenden Zellen und am Zentrosom von ruhenden Zellen nachgewiesen (Tsiokas et al., 2007). Die Funktionsarten von PC2 sind sowohl an der Plasmamembran als auch am primären Zilium möglich und erfordern Interaktionen mit anderen Kanaluntereinheiten wie PKD1, TRPC1, TRPC4, TRPV4 und Hilfsproteinen wie mDia1, Aktininen und KIF3A/B. Die meisten dieser Interaktionen scheinen für die ADPKD relevant zu sein, da sie bei pathogenen Mutanten von PC2 nicht vorhanden sind (Tsiokas, 2009).



**Abbildung 4: Funktionelle Untergliederung des PC2 (PKD2)-Kanals**

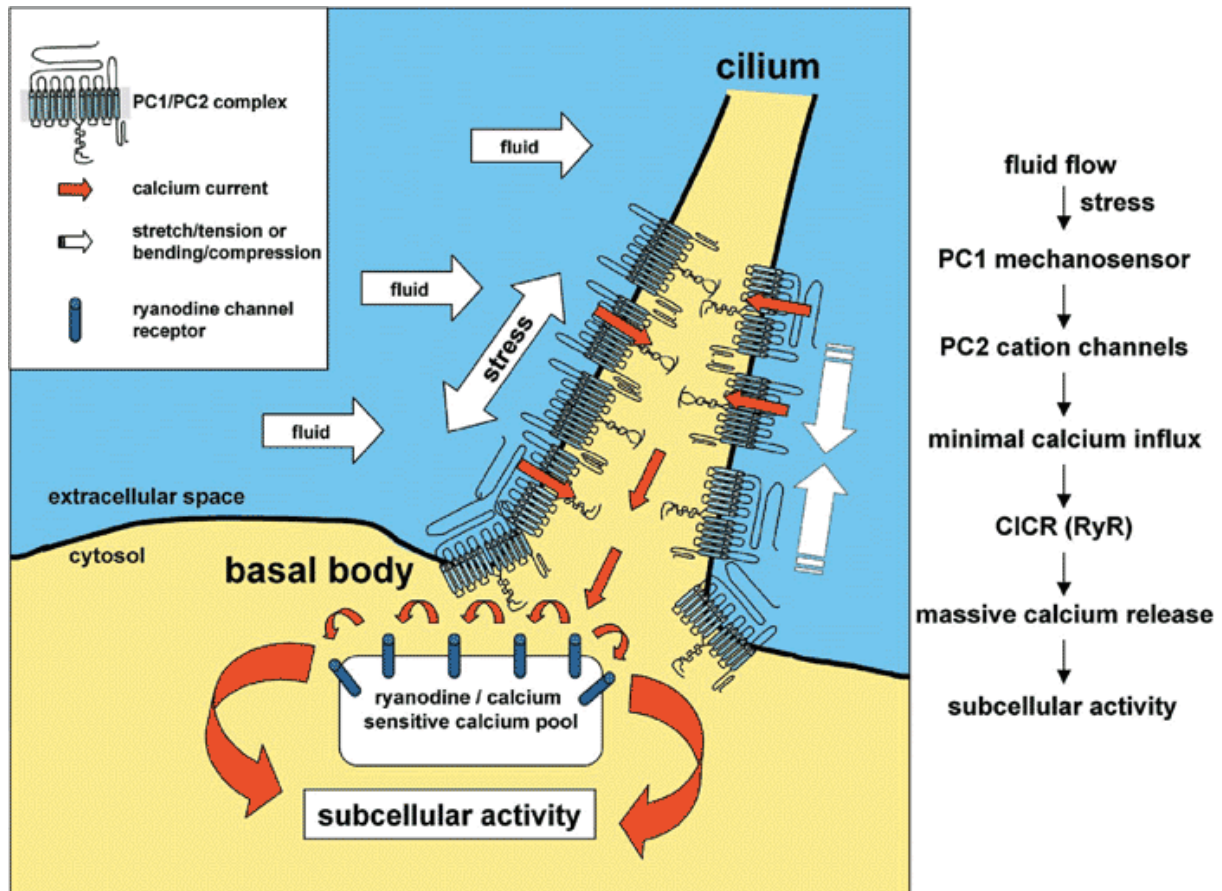
Es wird vermutet, dass PC2 an der Plasmamembran als rezeptorgesteuerter nicht-selektiver Kationenkanal, am ER als intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal und im primären Zilium als mechanosensitiver Kanal fungiert. Die vorhergesagte porenbildende Region ist grün dargestellt (Tsiokas et al., 2007).

### 1.3.3.1 PC2 am primären Zilium

Die meisten Epithelzellen, auch die der Niere, besitzen ein einzelnes primäres Zilium (Praetorius and Spring, 2003). Das Zilium dient hierbei als Sensor, um extrazelluläre Signale in die Zelle zu vermitteln. Eine abnorme Zilienstruktur und -funktion werden mit der Entwicklung der polyzystischen Nierenerkrankung (PKD) assoziiert (Davenport and Yoder, 2005; Huang and Lipschutz, 2014; Zhang et al., 2004). Das primäre Zilium dient in renalen Epithelzellen als Strömungssensor und vermittelt einen starken Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Polycystin-1 (PC1) und Polycystin-2 (PC2) sind an diesem Prozess entscheidend beteiligt (Praetorius and Spring 2003). Die Expression von PC1 und PC2 im primären Zilium konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (Geng et al., 2006; Luo et al., 2003; Pazour et al., 2002; Yoder et al., 2002). Cheng et al konnten am N-Terminus von PC2 ein konserviertes  $\text{R}_6\text{VxP}$ -Motiv (AS 1-15) identifizieren, das für die ziliäre Lokalisation erforderlich ist. Außerdem konnten sie feststellen, dass der PC2-Transport zum Zilium unabhängig von PC1 abläuft (Geng et al., 2006). Nauli et al. konnten an Mäusen zeigen, dass bei Tieren denen PC1 fehlt, dennoch

Zilien ausgebildet werden. Die normale Antwort auf einen Strömungsreiz am Zilium, resultierend in einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, bleibt jedoch aus. Antikörper gegen PC2 hatten ebenfalls zur Folge, dass die Antwort auf den Strömungsreiz nicht erfolgt. Sie schlagen vor, dass PC2 und PC1 gemeinsam für die Mechanotransduktion zuständig sind (Abbildung 5). Der Verlust von PC1 oder PC2 führt demnach deshalb zu ADPKD, da die Zellen nicht mehr fähig sind, die mechanischen Reize wahrzunehmen, die normalerweise die Morphogenese des Gewebes regulieren (Nauli et al., 2003). PC1 scheint der eigentliche Sensor zu sein und ist wahrscheinlich nicht nur mit PC2, sondern auch anderen mechanosensitiven Kanälen wie TRPV4 und TRPC1 gepaart (Qin et al., 2005; Raychowdhury et al., 2005; Tsiokas et al., 2007). Kottgen et al. beobachteten, dass der Abbau von TRPV4 in renalen Epithelzellen die strömungsinduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Antworten verhindert. TRPV4 könnte somit ebenso wie PC2 eine essentielle Komponente des ziliaren mechanosensorischen Apparats sein. Jedoch bildeten Zebrafische und Mäuse, denen TRPV4 fehlte, keine renalen Zysten aus (Kottgen et al., 2008). Eine interessante Tatsache ist außerdem, dass sich PC2 von der Mehrheit der Proteine mit EF-Händen in der Affinität für Kalzium unterscheidet, wahrscheinlich als Resultat einer konservierten Substitution in der EF-Hand-Schleife. Die primären Zilien scheinen spezialisierte Organellen zur Kalziumsignalübertragung zu sein, mit einer Kalziumkonzentration, die stark vom Zytosol abweicht. Die Aufgabe der Polycystinkanäle ist es wahrscheinlich, die Kalziumkonzentration im primären Zilium und damit auch die Signalwege zu regulieren. Die atypischen Kalzium-Bindungseigenschaften haben sich möglicherweise entwickelt, um Kalziumkonzentrationen in Bereichen wahrnehmen zu können, wie sie im Zilium vorherrschen (Allen et al., 2014; Delling et al., 2013). Delling et al. bezeichnen die primären Zilien als einzigartige Kalzium-Kompartimente und konnten zeigen, dass diese durch einen heteromeren TRP-Kanal (PKD1-L1/PKD2-L1) reguliert werden. Sind sind der Meinung, dass im Gegensatz zur gängigen Hypothese, die Veränderungen der Kalziumkonzentrationen im primären Zilium nicht in das Zytoplasma übertragen werden (Delling et al., 2013).





**Abbildung 5: Schematische Darstellung der strömungsinduzierten Scherkräfte und der Kalzium-Signalübertragung in embryonalen Nierenzellen der Maus**

Die Zilien verhalten sich wie eine Antenne, um die Bewegung der Flüssigkeit zu fühlen. PC1 dient seinen großen extrazellulären Domänen als sensorisches Molekül für die strömungsinduzierten Scherkräfte und übermittelt das Signal aus der extrazellulären Umgebung zu PC2 (PC2). Dieses produziert wiederum ein ausreichendes Einstromen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, um die intrazellulären Ryanodinrezeptoren (RyR) durch  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CICR) zu aktivieren. Der resultierende lokale Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration reguliert draufhin innerhalb der Zelle zahlreiche molekulare Aktivitäten, die zur Gewebeentstehung beitragen (Nauli et al., 2003).

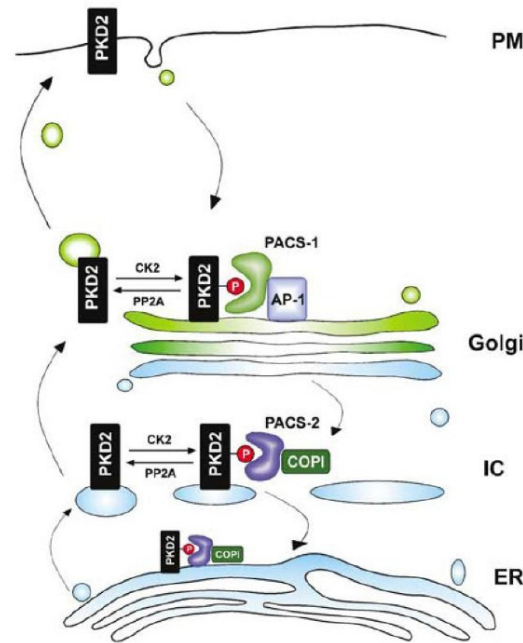
### 1.3.3.2 PC2 am Endoplasmatischen Retikulum

Cai et al. konnten zeigen, dass sich PC2 im ER ansammelt, aber keine signifikanten Mengen des Kanalproteins an der Plasmamembran feststellen. Sie konnten einen Cluster von sauren Aminosäuren im zytosolischen C-Terminus ermitteln, der für die Retention des Proteins am ER sorgte (Cai et al., 1999). Auch Chen et al. zeigten, dass PC2 in *Xenopus* Oozyten zu intrazellulären Kompartimenten befördert wird. Gekürztes Maus-PC2, das der natürlich vorkommenden humanen pathogenen Mutante PC2(742X) entspricht, der das ER-Retentionssignal fehlt, wird hingegen zur Plasmamembran befördert. Es zeigt dort Kanalaktivität, allerdings keine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Transportaktivitäten, da wahrscheinlich die EF-Hand bei dieser Mutante nicht mehr ausgebildet ist (Chen et al., 2001). Im Widerspruch dazu berichten Hanaoka et al. jedoch, dass diese PC2(742X) Mutante keinerlei Kanalaktivität in der Plasmamembran zeigt (Hanaoka et al., 2000). Koulen et al. konnten zeigen, dass PC2 in hohem Maße in der ER-Membran exprimiert wird und *in vivo* als kalziumaktivierter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal dient. Es wird vermutet, dass der PC2-Kanal die lokale intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration als Antwort auf einen anfänglichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg weiter

erhöht. Der Verlust des Signalwegs der regulierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung könnte für ADPKD verantwortlich sein (Koulen et al., 2002). Geng et al. konnten zeigen, dass Syntaxin-5 (Stx5) mit dem N-Terminus von PC2 interagiert. Sie vermuten, dass PC2 im ER für die Aufrechterhaltung der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase wichtig ist und Stx5 dazu dient, PC2 zu inaktivieren, um einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Austritt aus dem ER zu verhindern (Geng et al., 2008). Im Großen und Ganzen bestätigen die Daten verschiedener Studien, dass PC2 nicht nur am ER angelagert wird, sondern dort auch eine funktionelle Rolle bei der Regulierung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration spielt (Tsiokas et al., 2007).

### **1.3.3.3 PC2 an der Plasmamembran**

Die Funktion von PC2 als Ionenkanal in der Plasmamembran wurde von Hanaoka et al. beschrieben. In der Studie zeigte PC2 in CHO-K1-Zellen nur im Verbund mit Polycystin-1 (PC1) Kanalaktivität und war alleine nicht dazu fähig einen funktionellen Kanal auszubilden. Hanaoka et al. zeigten außerdem, dass PC1 für den Transport von PC2 zur Plasmamembran notwendig ist. Eine durch Mutationen eingeschränkte Interaktion von PC1 und PC2 könnte als Auslöser der ADPKD in Frage kommen (Hanaoka et al., 2000). Aus mehreren Studien, die zur PC2-Aktivität durchgeführt wurden, ergibt sich ein Gesamtbild, demnach PC2 in der Plasmamembran als Kanal mit konstitutiver Aktivität bei Überexpression fungieren könnte. Dieser Kanal ist ein nichtselektiver Kationenkanal, wobei die Selektivität von  $\text{Ca}^{2+}$  gegenüber  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  leicht erhöht ist. Zudem ist die Leitfähigkeit für  $\text{K}^+$  leicht erhöht (Cantiello, 2004; Tsiokas et al., 2007). Die Aktivität von PC2 in der Plasmamembran unterliegt diversen regulatorischen Mechanismen, z.B. dem Hin- und Herpendeln von PC2 zwischen ER und Plasmamembran, sowie verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen und weiteren Arten der Aktivierung (Tsiokas et al., 2007). Die Menge von PC2 an der Plasmamembran wird zum einen durch interagierende Proteine wie PC1 (Delmas et al., 2004; Hanaoka et al., 2000) und PIGEA-14 (Hidaka et al., 2004), zum anderen durch post-translationale Modifikationen wie durch CK2 (Kottgen et al., 2005) und GSK3 (Streets et al., 2006) dynamisch beeinflusst. Diese Regulierung der Menge von PC2 an der Plasmamembran kann als zusätzlicher Aktivierungsmechanismus angesehen werden, wenn PC2 dabei einen konstitutiven aktiven Kanal bildet (Tsiokas et al., 2007). Kottgen et al. entwickelten ein Modell zum Transport von PC2 zwischen ER und Plasmamembran (Abbildung 6). Hierbei wird durch die beiden Adapterproteine PACS-1 (phosphofurin acidic cluster sorting protein-1) und PACS-2 die subzelluläre Lokalisation von PC2 gesteuert. PACS-1 und PACS-2 erkennen einen Bereich im cytosolischen C-Terminus von PC2, in dem vermehrt saure Aminosäuren auftreten. Die Phosphorylierung von PC2 (an Ser812) durch Casein Kinase 2 (CK2) sorgt für eine Bindung an den PACS-2/COPI-Komplex, was einen Rücktransport von PC2 vom mittleren Kompartiment (IC) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) zur Folge hat. Die Dephosphorylierung durch Protein Phosphatase 2 (PP2A) löst PC2 vom PACS-2/COPI-Komplex und ermöglicht so die Translokation zur Plasmamembran. PACS-1/AP-1 ist am Transport von vorher durch CK2 phosphoryliertem PC2 zum trans-Golgi-Netzwerk beteiligt. Dephosphorylierung gibt PC2 wiederum von diesem Komplex frei (Kottgen et al., 2005). Des Weiteren hängt die Menge von PC2 an der Plasmamembran von der dortigen Interaktion mit anderen Kanaluntereinheiten wie PC1 (Delmas et al., 2004; Hanaoka et al., 2000; Newby et al., 2002; Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1999), TRPC1 (Tsiokas et al., 1999), TRPV4 (Kottgen et al., 2008) sowie sekundärer Aktivierung durch EGFR ab (Ma et al., 2005).



**Abbildung 6: Modell des PC2 (PKD2)-Transports**

Durch CK2 an Position Ser<sup>812</sup> phosphoryliertes PC2 bindet PACS-2/COPI und wird vom mittleren Kompartiment (IC) zum endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgeholt. Eine Dephosphorylierung von PC2 durch PP2A entlässt PC2 von dieser Interaktion und ermöglicht seine Translokalisierung zur Plasmamembran (PM). PACS-1/AP-1 vermittelt das Zurückholen von PC2 zum Golgi/TGN-Kompartiment (Kottgen et al., 2005).

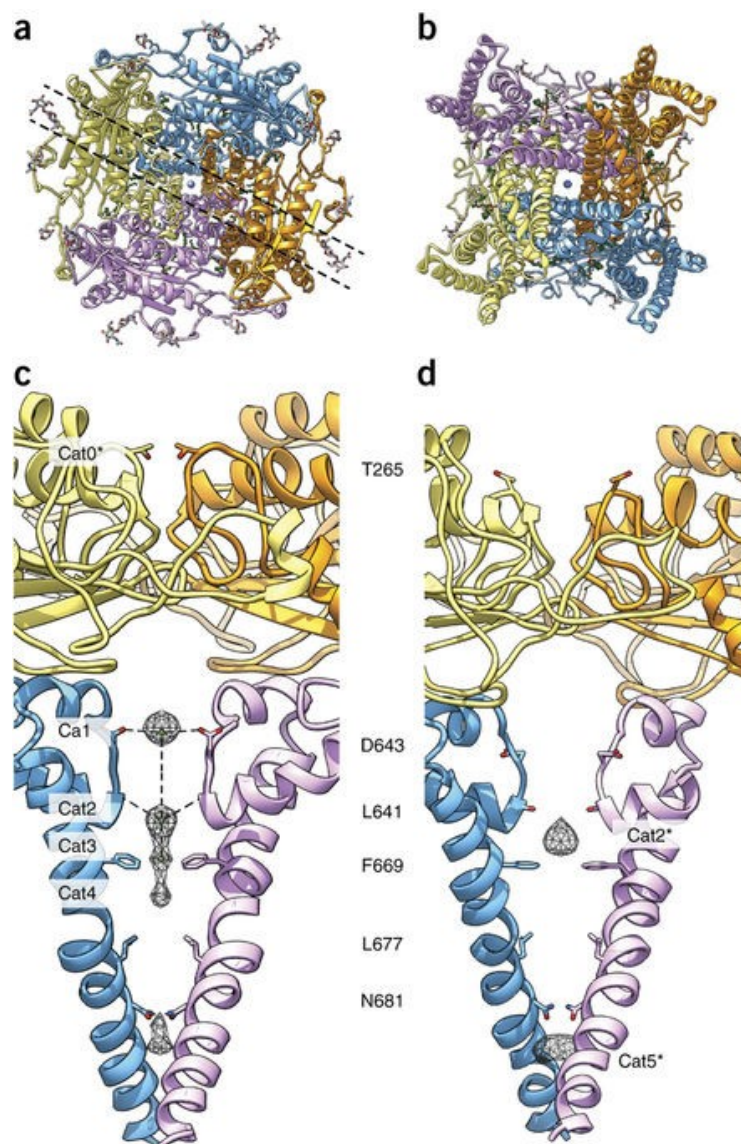
#### 1.3.3.4 PC2 am Spindelapparat und Zentrosom

Die Funktion von PC2 an den Spindeln und am Zentrosom ist noch nicht genau geklärt. Es konnte bisher gezeigt werden, dass das Formin mDia1 für den Transport von PC2 zu den mitotischen Spindeln nötig ist. Ein Knockdown von endogenem mDia1 in HeLa-Zellen führte sowohl zu einer reduzierten PC2-spezifischen Immunoreaktivität an den Spindeln als auch zu einem Rückgang der Amplitude der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Freisetzungstransienten. Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von PC2 an den Spindeln einerseits dazu dient, die symmetrische Aufteilung des Proteins zwischen Mutter- und Tochterzellen zu gewährleisten, andererseits die Ca<sup>2+</sup>-Signalübertragung während der Zellteilung zu regulieren (Rundle et al., 2004; Tsiokas et al., 2007). Jurczyk et al. konnten eine Expression von PC2 an den Spindelpolen von Zellen in der Metaphase und an den Zentrosomen von ruhenden Zellen nachweisen. Zudem konnten sie eine Koimmunopräzipitation von PC2 und Pericentrin sowie weiteren Komponenten des intraflagellaren Transportapparats (IFT) feststellen. Ein Knockdown von Pericentrin führte zum Zilienverlust. PC2, Pericentrin und IFT-Proteine wären demnach alle für die Funktion und den Zusammenbau der Zilien erforderlich. Es wird vorgeschlagen, dass die Funktion von PC2 auf Zentrosomebene der Zilienbildung vorgelagert ist (Jurczyk et al., 2004; Rosenbaum and Witman, 2002).

#### 1.3.4 Elektronenmikroskopie-Strukturen von PC2

Wilkes et al. beschreiben zwei mittels Kryo-Elektronenmikroskopie gelöste tetramere Strukturen des kompletten PC2-Kanals im Komplex mit Lipiden und Kationen (Abbildung 7). Die beiden Strukturen weisen konformationelle Unterschiede im Selektivitätsfilter und der großen exoplasmatischen TOP-Domäne auf. Es wird vorgeschlagen, dass in der von ihnen als PC2<sub>MI</sub> (multi-ion mode) bezeichneten

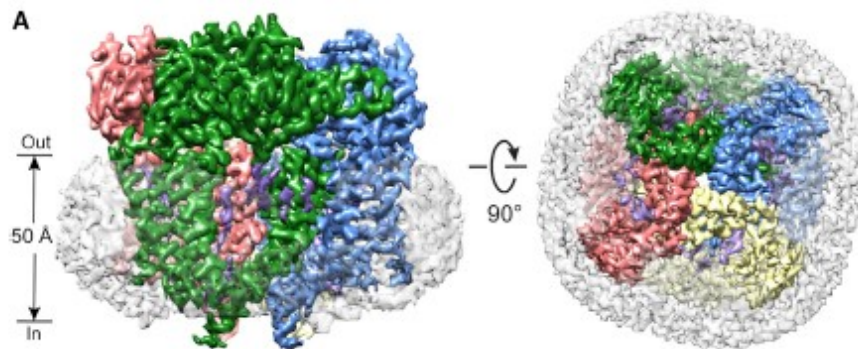
Konformation von PC2 die Kalziumbindung am Eingang des Selektivitätsfilters eine Blockade von monovalenten Kationenströmen zur Folge hat. Für die als PC2<sub>SI</sub> (single-ion mode) bezeichnete Konformation wird eine Interaktion der EF-Hand und R581 im S4-S5-Linker vorgeschlagen. Präselektivitätsfilter und Selektivitätsfilter sind hierbei in einem offeneren Zustand im Vergleich zu PC2<sub>MI</sub>. Bei PC2<sub>MI</sub> konnte das EF-Hand-Motiv nicht beobachtet werden (Wilkes et al., 2017). In Abbildung 8 ist die von Shen et al. mittels Kryo-Elektronenmikroskopie ermittelte homotetramere Struktur von PC2 abgebildet (Shen et al., 2016). Grieben et al. präsentieren eine ebenfalls mit Kryo-Elektronenmikroskopie gelöste tetramere Struktur, wobei sich PC2 im geschlossenen Zustand ohne Kationen befindet (Grieben et al., 2016).



**Abbildung 7: Kationenbindungsstellen in PC2**

a) Aufsicht auf PC2<sub>MI</sub>-Tetramer. Protomere in unterschiedlichen Farben, Kationen als Kugeln dargestellt. Gestrichelte Linien zeigen ungefähre Blickrichtung für c an. b) Zytoplasmatischer Blick auf PC2<sub>MI</sub>-Tetramer c) Kationen entlang des Durchgangs in PC2<sub>MI</sub> d) Kationen entlang des Durchgangs in PC2<sub>SI</sub> (Wilkes et al., 2017)





**Abbildung 8: PC2-Struktur in Lipid Nanodiscs**

Ansicht von der Seite (links) und von unten nach oben (rechts) von PC2 in Nanodiscs. Einzelne Untereinheiten farbcodiert (Shen et al., 2016)

## 1.4 Interaktionspartner von PC2

### 1.4.1 Das Formin Mammalian Diaphanous Homolog 1 (mDia1)

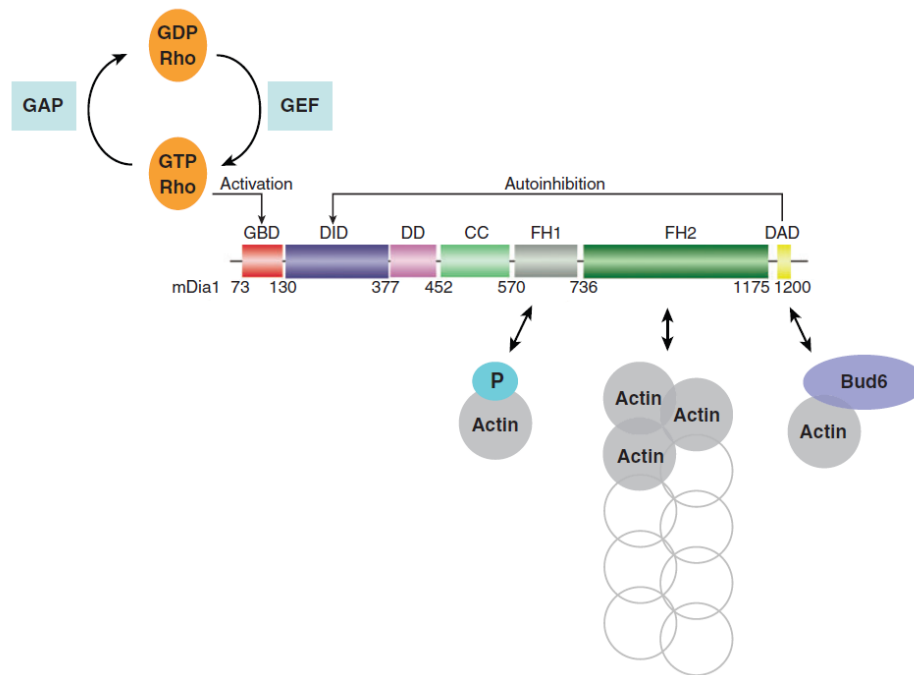
#### 1.4.1.1 *Formine*

Formine sind hochkonservierte Proteine, die eine essentielle Rolle bei der Umgestaltung des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts spielen und so die Form und das Verhalten der eukaryotischen Zelle bestimmen (Chesarone et al., 2010). Formine wurden zuerst als Gene in Fliegen, Mäusen und Hefen identifiziert, die bei Mutation schwere Defekte bei der Zytokinese, Zellpolarität sowie bei der Zell- und Gewebemorphogenese verursachen. Bei Säugetieren kodieren 15 Gene für die Proteinfamilie der Formine (Breitsprecher and Goode, 2013). Die Formine sind baukastenförmig zusammengesetzte Proteine und enthalten eine Reihe an konservierten Domänen, deren Zusammensetzung je nach Formin variiert. Außerhalb der Domänenbereiche nimmt die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz in der Gruppe der Formine ab (Higgs, 2005). Neuere Arbeiten haben zahlreiche zelluläre Faktoren identifiziert, die Formine rekrutieren, aktivieren oder inaktivieren, um deren Effekte auf die Aktinnukleation und die Aktinelongation zu regulieren (Chesarone et al., 2010). Formine initiieren die Aktinfilamentanlagerung über ihre formin homology 2 (FH2)-Erkennungsdomäne. Über die FH2-Domäne bleibt das Formin dabei ständig mit dem wachsenden Ende des Filaments verbunden, wobei es sowohl das schnelle Einfügen von Aktinuntereinheiten ermöglicht, als auch das Ende vor Capping-Proteinen schützt. Die benachbarte FH1-Domäne rekrutiert Profilin-Aktin-Komplexe und beschleunigt die Verlängerung des Aktinfilaments. Die meistexprimierten Formine befinden sich durch intramolekulare Interaktionen in einem autoinhibiertem Zustand und werden wahrscheinlich durch Rho-GTPasen und zusätzliche Faktoren aktiviert. Es gibt jedoch auch Formine, denen der Autoinhibitionsmechanismus fehlt und die auf eine andere Art und Weise reguliert werden (Goode and Eck, 2007).

#### 1.4.1.2 *Diaphonus Formine*

Eine Untergruppe der Formine bilden die Diaphonus Formine. Sie sind gekennzeichnet durch eine N-terminale Rho-GTPase-Bindedomäne (GBD) und eine FH3-Domäne (DID), welche die C-terminale Autoinhibitionsdomäne (DAD) bindet (Alberts, 2001; Goode and Eck, 2007; Higgs, 2005; Vetter and

Wittinghofer, 2001). Durch die Bindung von Rho-GTP wird die DAD-DID-Interaktion und somit die Autoinhibition aufgehoben, wodurch die Aktinfilamentverlängerung ermöglicht und initiiert wird (Goode and Eck, 2007; Maiti et al., 2012; Rose et al., 2005; Shimada et al., 2004; Watanabe et al., 1999). Rose et al. zeigten im Versuch, dass RhoA im Komplex mit dem GTP-Analogen 5'-Guanylylimidodiphosphate (RhoA-GppNHp) die DAD-DID-Interaktion auflöst, RhoA-GDP jedoch keinen Effekt hat. Sie ermittelten einen  $K_D$  von 6 nM für die Interaktion von RhoA-GppNHp mit mDia1 (Rose et al., 2005).

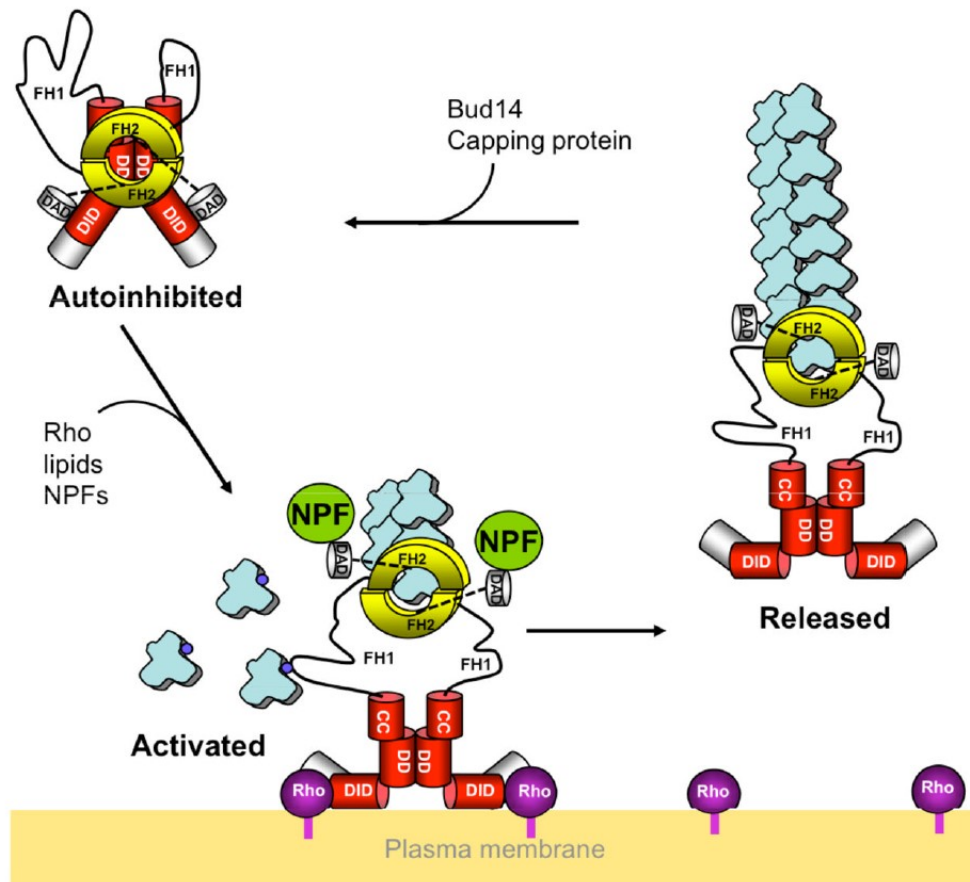


**Abbildung 9. Domänenstruktur der Diaphanous Formine und Liganden, von denen bekannt ist, dass sie die biochemischen Aktivitäten der Formine in Bezug auf Aktin regulieren**

Nummerierung = AS-Position in mDia1. Abkürzungen: Bud6, ein Protein. CC, Coiled-Coil-Domäne. DAD, Diaphanous autoregulatorische Domäne. DD, Dimerisierungsdomäne. DID, Diaphanous inhibitorische Domäne. FH1 und FH2, Formin Homolog 1 und 2. GAP, G-Protein-aktivierendes Protein. GBD, GTPase-bindende Domäne. GEF, Guaninnukleotid-Austauschfaktor. Autoinhibition wird über die Interaktion der C-terminalen DAD (gelb) mit der N-terminalen DID (blau) aufrechterhalten. Bindung von RhoGTP an die GBD-Domäne bewirkt die Aufhebung des autoinhibierten Zustandes. Die FH2-Domäne initiiert die Aktinfilamentanlagerung durch die Stabilisierung von Aktindimeren oder Aktintrimeren und bleibt während der Aktinfilamentelongation mit dem wachsenden Ende verbunden. Interaktionen von FH1 mit Profilin-(P)-Aktinen beschleunigen die Elongation. DAD-Interaktionen mit Bud6-Aktin verstärken die Aktinanlagerung. Bud6 existiert nur in Pilzen, der Mechanismus an sich könnte aber auch in anderen Organismen konserviert sein (Goode and Eck, 2007).

Maiti et al. isolierten und untersuchten erstmals das komplette Konstrukt des mammalian diaphanous-related formin 1 (mDia1-FL) (AS 55-1255) und stellten fest, dass es autoinhibierte Dimere bildet, die partiell durch RhoA aktiviert werden können. Eine Zusammenführung der Kristallstrukturen in einer 3D-Rekonstruktion zeigte eine gabelförmige N-terminale DID-CC-Region, die über der ringförmigen FH2-Domäne liegt (Abbildung 10). Es wird vermutet, dass die sterische Blockierung der Aktinbindung für die Autoinhibition verantwortlich ist. Eine Deletion der C-terminalen DAD-Domäne öffnete die mDia1-Struktur und aktivierte es für den Aktinzusammenbau. Mittels TIRF microscopy konnte außerdem beobachtet werden, dass RhoA-aktiviertes mDia-FL in Gegenwart von Profilin durchgängig die Aktinfilamentelongation forcierte. Des Weiteren wird

vermutet, dass weitere Faktoren nötig sind, um die Formine von den wachsenden Enden der Filamente zu entfernen und so die Filamentlänge zu begrenzen (Maiti et al., 2012).



**Abbildung 10. Modell der Regulation der mDia1-Aktivität**

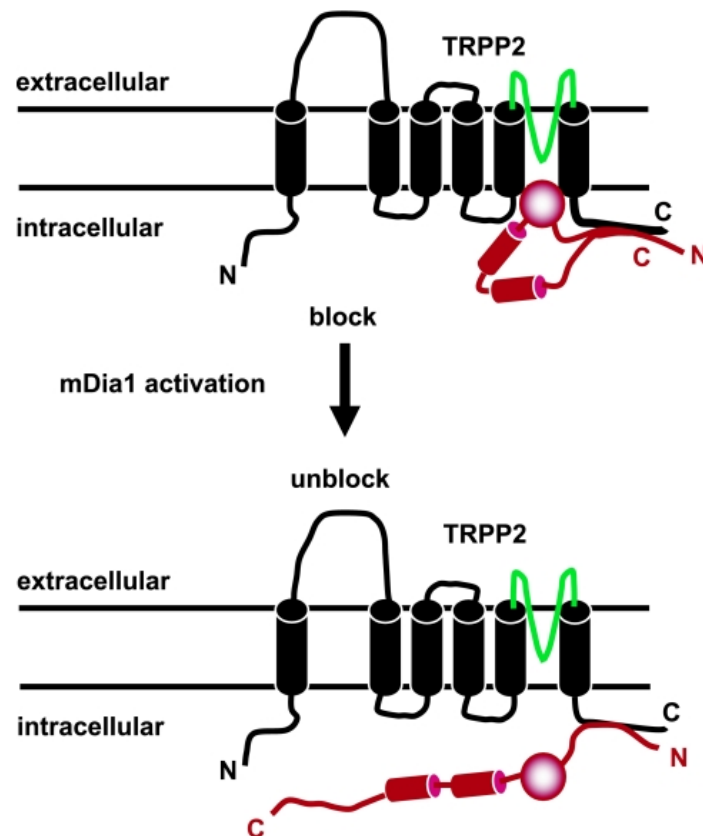
Autoinhibierte mDia1-Full-Length-Dimere (mDia1 FL: AS 55-1255) werden aus dem Zytoplasma zur Plasmamembran rekrutiert. Dies geschieht durch Interaktion mit Lipiden, prenyliertem RhoAGTP und möglicherweise zusätzlichen Liganden wie DAD-bindenden nucleation promoting factors (NPF). Diese Bindungen aktivieren mDia1-FL für den Aktinzusammenbau. NPFs ermöglichen den Eintritt in die Nukleationsphase beim Aktinzusammenbau (Gould et al. 2011; Okada et al. 2010; Vizcarra et al. 2011). In Folge dessen könnte mDia1 von der Membran freigegeben werden, möglicherweise als Antwort auf die RhoGTPase-Aktivität und/oder Veränderungen in der Lipidzusammensetzung. Die Daten lassen des Weiteren vermuten, dass aktivierte FL-mDia1-Dimere an die wachsenden Enden angeheftet bleiben bis andere Faktoren (z.B. Bud14 oder capping protein) mDia1-FL ersetzen und es in seinen autoinhibierten Zustand zurückkehrt (Maiti et al., 2012).

#### 1.4.1.3 Interaktion von mDia1 mit PC2

Rundle et al. zeigten, dass mDia1 für den Transport von PC2 zu den mitotischen Spindeln in der Metaphase von sich teilenden Zellen essentiell ist. Das Formin mDia gewährleistet dabei eine gleichmäßige Verteilung von PC2 auf die beiden Tochterzellen (Rundle et al., 2004; Tsiokas et al., 2007). Außerdem könnte die PC2-Aktivität die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalübertragung während der Zellteilung regulieren. Ein endogener mDia-Knockdown in HeLa-Zellen hatte den Verlust von PC2 an den mitotischen Spindeln zur Folge und veränderte die intrazelluläre Kalziumfreisetzung (Rundle et al., 2004). Des Weiteren konnten Kato et al. die Lokalisation von mDia1 mittels GFP-Fluoreszenz an den mitotischen Spindeln von HeLa-Zellen nachweisen (Kato et al., 2001). Der cytosolische C-Terminus

von PC2 (im Bereich nach Glu871) bindet den N-Terminus von mDia (AS 143-260). Dieser Abschnitt überlappt sowohl mit der RhoA-Bindedomäne (Aminosäuren 63-260), als auch mit der FH3-Domäne (Aminosäuren 157-456) (Rundle et al., 2004). Rundle et al. schlagen zwei mögliche Szenarien vor: Das erste wäre, dass PC2 mit RhoA um die mDia-Bindung konkurriert und bei Bindung eine ganz eigenes offenes und funktionelles mDia generiert, das jedoch immer noch alle Fähigkeiten besitzt, mit seinen Effektormolekülen zu interagieren. Die mDia-Aktivierung wäre also durch PC2 auch ohne RhoA möglich. Das zweite Szenario wäre, dass PC2 mDia in einem geschlossen, nichtfunktionellen Zustand hält und die FH1- und FH2-Domänen für Interaktionen blockiert. Der Transport von PC2 durch mDia zur mitotischen Spindle wäre dabei jedoch immer noch möglich. Es wird zudem diskutiert, ob die offene Konformation bei mDia für die PC2-Bindung notwendig ist. Da sie die C-terminale Autoinhibitionsdomäne teilweise abspalten, gehen Rundle et al. davon aus, mit der aktiven mDia-Konformation zu arbeiten und spekulieren zudem über einen solchen Abspaltungsmechanismus *in vivo*, der ein RhoA-unabhängiges mDia herstellen würde. Dieser wurde jedoch, wie sie selbst sagen, bisher noch nicht beobachtet (Rundle et al., 2004). Bai et al. stellten fest, dass mDia spezifisch bei physiologischen Ruhepotentialen (negatives Potential) PC2 bindet und blockiert. Das Formin mDia befindet sich hierbei im autoinhibierten Zustand (vgl. Abbildung 9, Abbildung 10). Eine Depolarisierung der Membran (positives Potential) oder Stimulation durch EGF resultierte in einer sequentiellen Aktivierung von RhoA und mDia1 (Bai et al., 2008). Es wird vermutet, dass aktiviertes mDia sich dann von PC2 entfernt und somit die Blockierung aufhebt. Hierfür wird ein "ball and chain"-Mechanismus (Abbildung 11) für die Steuerung von PC2 vorgeschlagen (Tsiokas, 2009). Interessant ist auch eine Studie von Cantero et al. von 2015, die feststellten, dass die Regulation von PC2 durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch aktinbindende Proteine beeinflusst und modifiziert wird. Sie beobachteten dabei, dass Profilin sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Kanalaktivität von PC2 verstärkt. Profilin-Aktin-Komplexe werden von der FH1-Domäne von mDia1 gebunden, wodurch die Aktinfilamentelongation beschleunigt wird (Cantero and Cantello, 2015).





**Abbildung 11: Aktivierung von PC2 durch mDia1**

Bei Ruhepotentialen blockiert autoinhibiertes mDia1 (rot) durch Bindung die PC2-Aktivität. Als Antwort auf eine Depolarisierung der Membran oder eine EGF-Stimulation wechselt mDia1 vom autoinhibierten in den aktiven Zustand und hebt hierbei die PC2-Blockade auf. Der vorhergesagte porenbildende Bereich von PC2 ist grün dargestellt. Die Formin-Homologie-Domänen FH1 und FH2 sind als rote Zylinder dargestellt (Tsiokas, 2009).

## 1.4.2 Weitere Interaktionspartner von PC2

### 1.4.2.1 Actin-binding proteins (ABPs)

Das Protein  $\alpha$ -Actinin bündelt Aktin und erhöht die Kanalaktivität von PC2 in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, wirkt jedoch in deren Abwesenheit inhibitorisch. Filamin, das sich Aktin-Bindedomänen mit  $\alpha$ -Actinin teilt, hatte einen starken inhibitorischen Effekt auf PC2 in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, aber nicht in deren Abwesenheit. Gelsolin stimulierte die Kanalaktivität in bei Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und wirkte sonst hemmend. Profilin, das sich Aktin-Bindedomänen mit Gelsolin teilt, erhöhte die PC2-Kanalaktivität sowohl in An- als auch in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (Cantero and Cantiello, 2015).

### 1.4.2.2 Polycystin-1 (PC1)

Ein bekannter Interaktionspartner von Polycystin-2 (PC2) ist Polycystin-1 (PC1): Polycystin-1 ist ein großes integrales Protein (4302 AS, 460kD), besitzt eine lange extrazelluläre N-terminale Domäne, elf Transmembrandomänen und einen kurzen intrazellulären C-Terminus (Hughes et al., 1995; Nims et al., 2003). Es wird vermutet, dass es als G-Protein gekoppelter Rezeptor (GPCR) fungiert (Zhou, 2009). Es weist im extrazellulären Bereich zahlreiche Domänen auf, die für Ligandenbindung (Protein-

Protein-, Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen) und Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen eine Rolle spielen könnten. Der zytoplasmatische Anteil reguliert wahrscheinlich durch Bindung an den PC2-Ionenkanal und heterotrimere G-Proteine die intrazelluläre Signaltransduktion (A. Li et al., 2003; Yao et al., 2014). Die Zusammenarbeit von PC1 und PC2 sieht im Modell wie folgt aus: PC1 dient als Mechano- oder Chemosensor am primären Zilium und reguliert die Aktivität des PC2-Kalziumkanals 32, 33 und 34 (Fedeles et al., 2014). PC2 und Polycystin-1 interagieren dabei über ihre coiled-coil Domänen (Abbildung 12) miteinander (Mochizuki et al., 2013). Der ausgebildete Ionenkanalkomplex wandelt extrazelluläre Stimuli in Ionenströme um. Jedoch ist die molekulare Beschaffenheit dieser Stimuli relativ unklar. Funktionelle Studien in Zellkulturen zeigen, dass PC2 an der Zelloberfläche durch mechanische Reize, Rezeptortyrosinkinase (RTK) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden kann (Tsiokas, 2009).

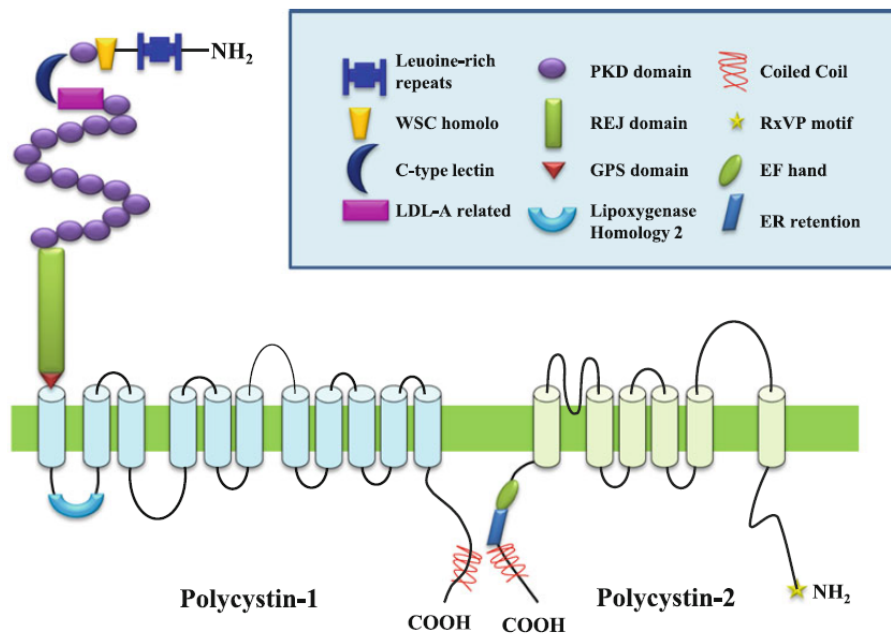


Abbildung 12: Schematische Darstellung von Polycystin-1 und Polycystin-2 (Mochizuki et al., 2013)

### 1.4.2.3 Family of Rab11-interacting protein 2 (FIP2)

Der Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) ist ein entzündungssteigerndes Zytokin, das sich in der Zystenflüssigkeit von ADPKD-Erkrankten findet. Das Gerüstprotein FIP2 wird durch TNF- $\alpha$  induziert und interagiert mit PC2. Es verhindert, dass PC2 zum primären Zilium transloziert wird. In Mausversuchen führte die Behandlung mit TNF- $\alpha$  zu Zystenbildung. Bei Pkd2<sup>+/-</sup>-Mäusen wurde durch die Gabe des TNF- $\alpha$ -Inhibitors Etanercept die Zystenbildung verhindert (Li et al., 2008).

#### **1.4.2.4 Polycystin-2 (PC2) interactor, Golgi- and endoplasmic reticulum-associated protein with a molecular mass of 14 kDa (PIGEA-14)**

Das Coiled-Coil Protein PIGEA 14 reguliert wahrscheinlich die intrazelluläre Verteilung von PC2 und ist für die Translokation zum trans-Golgi-Netzwerk verantwortlich (Hidaka et al., 2004)

#### **1.4.2.5 Phosphofurin acidic cluster sorting protein (PACS-1 und PACS-2)**

Durch die beiden Adapterproteine PACS-1 und PACS-2 wird die subzelluläre Lokalisation von PC2 gesteuert. PACS-1 und PACS-2 erkennen einen Bereich im cytosolischen C-Terminus von PC2, in dem vermehrt saure Aminosäuren auftreten. Die Phosphorylierung von PC2 (an Ser812) durch Casein Kinase 2 (CK2) sorgt für eine Bindung an den PACS-2/COPI-Komplex, was für einen Rücktransport von PC2 vom mittleren Kompartiment (IC) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) sorgt. Die Dephosphorylierung durch Protein Phosphatase 2 (PP2A) löst PC2 vom PACS-2/COPI-Komplex und ermöglicht so die Translokation zur Plasmamembran. PACS-1/AP-1 ist am Transport von vorher durch CK2 phosphoryliertem PC2 zum trans-Golgi-Netzwerk beteiligt. Dephosphorylierung gibt PC2 wiederum von diesem Komplex frei (vgl. PC2 an der Plasmamembran) (Kottgen et al., 2005).

#### **1.4.2.6 Pericentrin**

Pericentrin formt zusammen mit intraflagellaren Transportproteinen und PC2 einen Komplex, der für den Zusammenbau der primären Zilien erforderlich ist (Jurczyk et al., 2004).

#### **1.4.2.7 Collectrin**

Collectrin findet sich im primären Zilium und in Vesikeln nahe des Basalkörpers von Sammelrohrzellen. Es ist an der intrazellulären und ziliaren Bewegung von Vesikeln und Membranproteinen beteiligt. Die Störung von Collectrin hat starke Defizite bei der renalen Aminosäureaufnahme zur Folge, da durch den Collectrinmangel die Anzahl vieler Aminosäuretransporter an den luminalen Membranen verringert wird. Generell scheint Collectrin für die Instandhaltung des primären Ziliums und die Zellpolarität von Sammelrohrzellen eine große Rolle zu spielen (Jurczyk et al., 2004).

#### **1.4.2.8 Kinesin-2-Untereinheiten KIF3A und KIF3B (ARPKD)**

PC2 und Fibrocystin/Polyductin (FPC) befinden sich im selben Komplex, aber nur wenn KIF3B, eine Motoruntereinheit von Kinesin-2 anwesend ist. Trotzdem konnte keine direkte Verbindung zwischen den intrazellulären Termini von PC2 und FPC gefunden werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird ein PC2-KIF3-FPC-Komplex postuliert. Der FPC-C-Terminus stimuliert die Kanalaktivität von PC2, aber nur im Verbund mit KIF3B. FPC oder KIF3B alleine zeigen keinen Effekt. Kinesin-2 kann also als Linker zwischen PC2 und FPC betrachtet werden, der die Regulation des PC2-Kanals durch FPC vermittelt. KIF3A reguliert durch Bindung die Aktivität von PC2 in den primären Zilien (Wu et al., 2006).

#### **1.4.2.9 Fibrocystin/Polyductin (FPC) (ADPKD und ARPKD)**

PC2 und FPC und Polycystin-1 kolokalisieren an der Plasmamembran und in den primären Zilien. Setzt man Antikörper gegen extrazelluläre Epitope von FPC ein, werden flussinduzierte zelluläre Kalziumantworten blockiert. Es wird vermutet, dass PC2, Polycystin-1 und FPC alle an einem gemeinsamen mechanotransduktiven Vorgang beteiligt sind, wobei FPC die strömungsinduzierte Kalziumantwort moduliert (Wang et al., 2007). Der C-Terminus von FPC interagiert mit dem N-Terminus von PC2. Ein Verlust von FPC führt zur Herabregulation von PC2 *in vivo* und steigert außerdem die Schwere der Erkrankung bei PC2-Mutanten. Durch FPC-Zugabe kann ein zuvor induzierter Verlust von FPC wieder kompensiert und somit die Herabregulation von PC2 verhindert werden. Im Mausmodell hat die Herabregulation von PC2 bei ADPKD ähnliche Phänotypen wie bei ARPKD-Mäusen zur Folge. Dieses deutet auf einen gemeinsamen Mechanismus für das Zystenwachstum bei ADPKD und ARPKD hin (Kim et al., 2008).

#### **1.4.2.10 Epidermal growth factor receptor (EGFR) und Phospholipase C- $\gamma$ 2**

Durch die Aktivierung von EGFR wird PC2 von der Inhibition durch Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) befreit. Hierbei induziert die Phospholipase C- $\gamma$ 2 (PLC- $\gamma$ 2) die Aktivierung von PIP<sub>2</sub> durch Hydrolyse, während die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) die Umwandlung von PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> anregt (Ma et al., 2005; Torres and Harris, 2009).

#### **1.4.2.11 Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R)**

PC2 interagiert mit IP3R und moduliert dessen Aktivität (Y. Li et al., 2005). Der Cluster saurer Aminosäuren im C-Terminus von PC2 bindet stark an einen Cluster positiv geladener Aminosäuren in der N-terminalen Liganden-Binde-Domäne (LBD) von IP3R. PC2-IP3R-Interaktion verstärkt die kalziuminduzierte Kalziumfreisetzung (Sammels et al., 2010).

#### **1.4.2.12 Ryanodine receptor 2 (RyR2)**

Der N-terminale Teil von PC2 bindet RyR2. Auch der C-Terminus von PC2 bindet RyR2, aber nur RyR2 im offenen Zustand und inhibiert dabei dessen Kanalaktivität in Anwesenheit von Kalzium. PC2 scheint wichtig für die Regulation von RyR2 zu sein. Mutiertes PC2 führt zu Verlust dieser Regulation und zu veränderter Kalziumsignalweiterleitung im Herz (Anyatonwu et al., 2007).

#### **1.4.2.13 Syntaxin 5**

Syntaxin 5 interagiert mit dem N-Terminus (AS 5-72) von PC2 und reduziert dadurch die Kanalaktivität bzw. inaktiviert es. Dadurch verhindert es den Austritt von Kalzium aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums (Geng et al., 2008).

#### **1.4.2.14 Transient receptor potential channels TRPC1 und TRPC4**

PC2 interagiert mit TRPC1 und TRPC4 in Mesangiumzellen. PC2 interagiert mit TRPC1 sowohl durch seine C-terminale coiled-coil Domäne als auch durch seine Transmembrandomäne. Möglicherweise

fügen sich TRPC1 und TRPC4 selektiv mit PC2 zusammen und formen Kanalkomplexe in den Mesangiumzellen, um Angiotensin II (ANG II) induzierte Kalziumantworten zu vermitteln (Du et al., 2008).

#### ***1.4.2.15 Transient receptor potential channel subfamily V member 4 (TRPV4)***

PC2 ist alleine nicht mechanosensitiv. Zusammen mit TRPV4 kann es jedoch einen mechano- und thermosensitiven Kanal im primären Zilium ausbilden. Fehlendes TRPV4 in renalen Epithelzellen führt dazu, dass die strömungsinduzierte Signalweiterleitung durch Kalziumfreisetzung unterbrochen ist. TRPV4 ist somit ein essentieller Bestandteil des ziliaren Mechanosensors. Es interagiert mit dem C-Terminus von PC2 (Kottgen et al., 2008).

#### ***1.4.2.16 Pancreatic ER-resident eIF2 $\alpha$ kinase (PERK)***

PC2 fördert die Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$  durch PERK und reguliert auf diese Weise die Zellproliferation herab. Die pathogenen Mutanten PC2 E837X und R872X machen dies nicht. PC2 wurde im selben Komplex mit eIF2 $\alpha$  und PERK gefunden (Liang et al., 2008b).

#### ***1.4.2.17 Helix-loop-helix protein Id2***

PC2 wird in Abhängigkeit von Polycystin-1 (PC1) phosphoryliert. Dies steigert seine Interaktion mit dem Helix-Loop-Helix-Inhibitor Id2, der in Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsprozesse involviert ist. Auf diese Weise sind PC2 und PC1 an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (X. Li et al., 2005; Liang et al., 2008a).

#### ***1.4.2.18 CD2-associated protein (CD2AP)***

Die C-terminalen Bereiche der Proteine CD2AP und PC2 interagieren miteinander (Lehtonen et al., 2000). CD2AP spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Regulation des Aktinzytoskeletts und könnte als direkter Adapter zwischen dem Aktinzytoskelett und PC2 (sowie anderen Membranproteinen) dienen (Lehtonen et al., 2002).

#### ***1.4.2.19 HCLS1-associated protein X-1 (Hax-1)***

Hax-1 bindet sowohl PC2 als auch das F-Aktin bindende Protein Cortactin. Dies könnte eine mögliche Verbindung von PC2 zum Aktinzytoskelett sein, die bei mutiertem PC2 gestört ist und die Zystenbildung zur Folge hat (Gallagher et al., 2000).

#### ***1.4.2.20 Tropomyosin-1 (TM-1)***

Tropomyosin ist Teil des Aktinmikrofilament Netzwerks. Sowohl TM-1, als auch eine bestimmte Splicing-Isoform von Tropomyosin (TM-1a), die im Herz und den Nieren vorkommt, interagieren direkt mit dem cytosolischen C-Terminus von PC2. Die Interaktionsstellen liegen im Bereich von

G821-R878 für PC2 (Coiled-Coil-Domäne) und A152-E196 für TM-1a (gemeinsamer Bereich von TM-1 und TM-1a). Frühere Arbeiten beschreiben die TM-1 als Suppressor neoplastischen Wachstums transformierter Zellen. Daher ist es gut möglich, dass Tropomyosin zur Zystenbildung und –vergrößerung beiträgt, wenn die Verankerung von PC2 an die Aktinfilamente mittels TM-1 verändert ist (Q. Li et al., 2003a).

#### **1.4.2.21 Troponin-I**

Troponin-I stellt eine wichtige regulatorische Komponente des Aktinmikrofilaments in Herzmuskelzellen dar. Der cytosolische C-Terminus von PC2 bindet Troponin-I mit einem wahrscheinlichen stöchiometrischen Verhältnis von 1:1. Die interagierenden Domänen sind die Abschnitte R872-H927 bei PC2 und M1-V107/K106-L158 bei Troponin-I. Auch skelettale Isoformen von Troponin-I binden PC2. Dies ist ein weiterer Hinweis für die direkte Interaktion von PC2 mit dem Aktinmikrofilament. Troponin-I fungiert als inhibitorische Untereinheit des Troponinkomplexes für die kalziumabhängige Regulation der Muskelkontraktion und als Inhibitor der Angiogenese (Wachstum von Blutgefäßen). Möglicherweise spielt eine aufgrund von Polycystin-1 (PC1)- und PC2-Mutationen veränderte Interaktion eine Rolle bei der Angiogenese bei ADPKD (Q. Li et al., 2003c). Eine native Isoform von PC2, Polycystin-L, kommt zusammen mit Troponin-I im Herzen vor und bindet dieses. In voltage-clamp Experimenten konnte gezeigt werden, dass die kalziuminduzierte Aktivierung des Kanals Polycystin-L durch verschiedene Troponin-I Isoformen inhibiert wird (Q. Li et al., 2003b).

#### **1.4.2.22 Homocysteine-induced endoplasmic reticulum protein (Herp) und ATPase p97**

Endoplasmic reticulum(ER)-associated degradation (ERAD) ist ein essentieller Prozess zur Aufrechterhaltung der Homöostase in der Zelle. Hierbei werden schlecht gefaltete Proteine erkannt, am ER ubiquitiniert und im Folgenden zum 26S Proteasom im Zytosol transportiert, wo die proteolytische Eliminierung stattfindet. Auch der Abbau von PC2 wird mittels ERAD durch das Ubiquitin-Proteasomsystem reguliert. PC2 interagiert hierfür mit der bekannten ERAD Komponente ATPase p97 und immobilisiert diese in der perinuklearen Region. PC2 bindet zudem Herp, ein ubiquitin-ähnliches Protein des ERAD-Systems. Herp ist essentiell für den Abbau von PC2 und fördert diesen. Dieser Prozess wird bei ER-Stress beschleunigt, wahrscheinlich zum Großteil durch die erhöhte Herp-Expression. Herp interagiert auch mit verschiedenen PC2-Mutanten (z.B. R872X und E837X) und fördert deren Abbau. Fehlen jedoch bei PC2 sowohl der N- als auch der C-Terminus findet keine Interaktion mit Herp mehr statt. Diese könnte bei der Pathogenese der ADPKD eine wichtige Rolle spielen, da hierbei die Regulation der PC2-Expression durch ERAD verändert wäre (Liang et al., 2008a).

#### **1.4.2.23 Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ)**

TAZ-Knockout Mäuse entwickeln die polyzystische Nierenerkrankung und Emphyse. Hierbei wird PC2 als Folge des verminderten Abbaus durch den SCF<sup>β-Trcp</sup> E3-Ubiquitin-Ligaseweg in den Nieren überexprimiert. TAZ interagiert mit dem zytosolischen C-Terminus von PC2, verbindet dieses mit dem

SCF<sup>β-Trcp</sup> E3-Ligasekomplex und steigert so die ubiquitinabhängige Proteolyse von PC2 (Tian et al., 2007).

#### **1.4.2.24 Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3)**

Neben der fünf vorhergesagten Phosphorylierungsstellen (z.B. Ser<sup>812</sup>) am zytosolischen C-Terminus von PC2 existiert auch eine Phosphorylierungsstelle am N-Terminus an Position Ser<sup>76</sup>. Ser<sup>76</sup> wird durch Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert. Auf diese Weise könnte die Oberflächenlokalisierung von PC2 gesteuert werden. Die Position Ser<sup>76</sup> scheint funktionell wichtig für die Aufrechterhaltung der normalen glomerulären sowie tubulären Morphologie zu sein. Die Erkennungssequenz für GSK3 (Ser<sup>76</sup>/Ser<sup>80</sup>) ist evolutionär stark konserviert (Streets et al., 2006).

#### **1.4.2.25 Exocyst Protein Sec10**

Exocyst ist ein evolutionär hochkonservierter Membrantransportkomplex, der aus acht Proteinen besteht. Ein Knockdown der Exocystkomponente Sec10 ergibt zelluläre Phänotypen, die man sonst mit ADPKD in Verbindung bringt. So kann man das Fehlen der strömungsinduzierten Erhöhung der Kalziumlevel sowie Hyperproliferation beobachten. Es wurden Interaktionen zwischen Exocyst Sec 10 und den ziliären Proteinen IFT88, IFT20 und PC2 festgestellt. Exocyst Sec 10 kolokalisiert mit PC2 im primären Zilium und scheint für dessen Transport dorthin verantwortlich zu sein (Fogelgren et al., 2011).

## **1.5 Vorstellung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine**

### **1.5.1 Der zytosolische C-Terminus von PC2**

Es gibt eine große Anzahl von Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteinen mit vielfältigen Funktionen, die als EF-Hand-Protein-Superfamilie zusammengefasst werden. Sie alle enthalten ein EF-Hand-Motiv mit einer Helix-Loop-Helix-Struktur, die verantwortlich für die Ca<sup>2+</sup>-Bindung ist. Bei vielen Mitgliedern der Superfamilie induziert die Ca<sup>2+</sup>-Bindung eine Konformationsänderung im EF-Hand-Motiv, was wiederum zu einer Aktivierung oder Inaktivierung von Zielproteinen führen kann, wie es z. B. bei Calmodulin oder Troponin C der Fall ist (Yap et al., 1999). Auch für den zytosolischen C-Terminus von PC2 wurde eine Konformationsänderung durch Ca<sup>2+</sup>-Bindung beobachtet (Allen et al., 2014; Petri et al., 2010; Schumann et al., 2009a). Es wurden zwei EF-Hände für die Bereiche AS 727-739 (atypische EF-Hand 1) bzw. AS 763-774 (kanonische EF-Hand 2) (Mochizuki et al., 1996; Schumann et al., 2009a), zwei Coiled-Coil-Domänen in den Abschnitten AS 781-796 und AS 835-873 (Giamarchi et al., 2010; Mochizuki et al., 1996; Qian et al., 1997) sowie ein ER-Retentionssignal im Bereich AS 787-820 identifiziert (Cai et al., 1999). Jedoch postulieren sowohl Allen et al. als auch Ćelić et al., dass die atypische EF-Hand 1 mit der kanonischen EF-Hand 2 zwar interagiert und mit ihr eine gemeinsame Struktur ausbildet, jedoch kein Ca<sup>2+</sup> binden kann (Allen et al., 2014; Ćelić et al., 2008). Für den Bereich der EF-Hände existieren drei NMR-Strukturen von Schumann et al. (PDB: 2KLE, 2KLD), Allen et al. (PDB: 2Y4Q) und Petri et al. (PDB: 2KQ6) (Allen et al., 2014; Petri et al., 2010; Schumann et al., 2009b). Zudem existiert eine Kristallstruktur für die Coiled-Coil-Domäne (PDB: 3HRN, 3HRO) (Yu et al., 2009). Abbildung 13 zeigt die Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten C-terminalen

Fragmente von PC2. Die atypische EF-Hand 1 (AS 727-739) und die kanonische EF-Hand 2 (AS 763-774) sind in der Sequenz hellgrün hinterlegt. Bei ADPKD ist der cytosolische C-Terminus von PC2 oft mutiert oder verkürzt (Petri et al., 2010). Zudem wurden N-terminale  $\alpha$ -helikale Bereiche für AS 683-692 und 699-717 vorhergesagt (Schumann et al., 2009a). Petri et al. gehen wie davon aus, dass sich bei PC2(720-797) ein nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Helix-Loop-Helix-Motiv (Helices 1 und 2) an die kanonische EF-Hand (Helices 3 und 4) anlagert. Dieses nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Motiv hat sich nach Petri et al. aus einer kanonischen EF-Hand entwickelt, wie man sie bei PC2 von Wirbellosen findet (Petri et al., 2010). Auch Allen et al. gehen für das Fragment PC2(717-792) von nur einer  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden EF-Hand aus (Allen et al., 2014). Für PC2(720-797) wurde von Ćelić et al. mittels ITC ein  $K_D$ -Wert von 214  $\mu\text{M}$  für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ermittelt, während sie bei PC2(704-968) eine viel höhere Affinität beobachteten ( $K_D = 12 \mu\text{M}$ ). Die Mutante T771A/E774A von PC2(704-968) kann kein  $\text{Ca}^{2+}$  binden. Aufgrund der höheren Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beim längeren Fragment gehen Ćelić et al. davon aus, dass Regionen außerhalb der Aminosäuren 720-797 für die Stabilisierung der Kalziumbindungsstelle notwendig sind (Ćelić et al., 2008). CD-Messungen von Ćelić et al. zeigten ebenso wie Messungen von Eberhardt und Allen et al. eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Konformationsänderung für C-terminales PC2 (Allen et al., 2014; Ćelić et al., 2008; Eberhardt, 2011).

	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702
A	I	N	D	T	Y	S	E	V	K	S	D	L	A	Q	Q	K	A	E	M	E	L	S	D
B																							
C																							

	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725
A	L	I	R	K	G	Y	H	K	A	L	V	K	L	K	L	K	K	N	T	V	D	D	I
B															L	K	K	N	T	V	D	D	I
C																		N	T	V	D	D	I

	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748
A	S	E	S	L	R	Q	G	G	G	K	L	N	F	D	E	L	R	Q	D	L	K	G	K
B	S	E	S	L	R	Q	G	G	G	K	L	N	F	D	E	L	R	Q	D	L	K	G	K
C	S	E	S	L	R	Q	G	G	G	K	L	N	F	D	E	L	R	Q	D	L	K	G	K

	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771
A	G	H	T	D	A	E	I	E	A	I	F	T	K	Y	D	Q	D	G	D	Q	E	L	T
B	G	H	T	D	A	E	I	E	A	I	F	T	K	Y	D	Q	D	G	D	Q	E	L	T
C	G	H	T	D	A	E	I	E	A	I	F	T	K	Y	D	Q	D	G	D	Q	E	L	T

	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794
A	E	H	E	H	Q	Q	M	R	D	D	L	E	K	E	R	E	D	L	D	L	D	H	S
B	E	H	E	H	Q	Q	M	R	D	D	L	E	K	E	R	E	D	L	D	L	D		
C	E	H	E	H	Q	Q	M	R	D	D	L	E	K	E	R	E	D	L	D	L	D	H	S

	795	796	797
A	S	L	
B			
C	S	L	P

A	PC2(680-796)
B	PC2(717-792)
C	PC2(720-797)

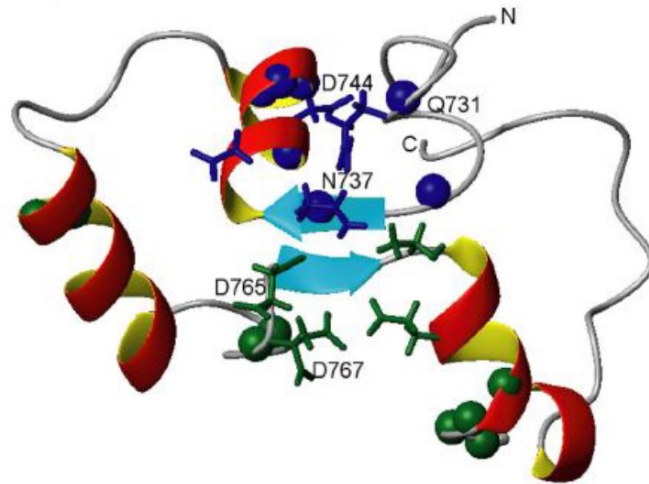
**Abbildung 13: Aminosäuresequenzen der verwendeten C-terminalen Fragmente von PC2**

Reihe A (grün): PC2(680-796). Reihe B (dunkelblau): PC2(717-792). Reihe C (orange): PC2(720-797). In der Sequenz hellgrün eingezeichnet sind EF-Hand 1 (AS 727-739) und EF-Hand 2 (AS 763-774). Nicht markiert: Coiled Coil: AS 781-796, ER-Retentionssignal AS 787-820.



#### 1.5.1.1 PC2(680-796)

Die 3D-Struktur in Abbildung 14 für das 117 Aminosäuren lange Fragment PC2(680-796) wurde von Schumann et al. gelöst (PDB: 2KLE, 2KLD). Schumann et al. postulieren eine kanonische (AS 763-774) und eine atypische EF-Hand (AS 727-739). Die ermittelten Bindungskonstanten für  $\text{Ca}^{2+}$  betragen 55  $\mu\text{M}$  für die kanonische und 179  $\mu\text{M}$  für die atypische EF-Hand. Zudem konnten Schumann et al. eine Monomerisierung von PC2(680-796) durch  $\text{CaCl}_2$ -Zugabe unter Hochsalzbedingungen feststellen (Schumann et al., 2009a). Mittels CD-Spektroskopie konnte gemessen werden, dass sich der  $\alpha$ -Helix-Anteil bei Zugabe von 2 mM Kalzium von 30 auf 47% erhöht (Eberhardt, 2011).



**Abbildung 14: PC2(680-796) mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen**

Gezeigt wird die Ribbondarstellung der Konformation mit der niedrigsten Energie, die durch das AUREMOL-ISIC refinement erhalten wurde. Die Seitenkettengruppen der an der Kalziumbindung beteiligten Aminosäuren sind für EF-Hand 1 blau und für EF-Hand 2 grün dargestellt (Schumann et al., 2009a).

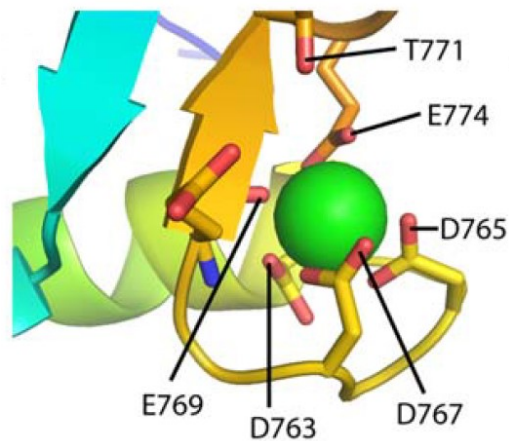
#### 1.5.1.2 PC2(717-792)

Für das mit 76 Aminosäuren Länge deutlich kürzere Fragment PC2(717-792) wurde die 3D-Struktur (Abbildung 15, Abbildung 16) von Allen et al. gelöst (PDB: 2Y4Q). Allen et al. postulieren die Existenz von nur einer kanonischen EF-Hand (AS 763-774). Es wurde durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) ermittelt, dass PC2(717-792) ein einzelnes  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion mit einer Affinität von  $122 \pm 5.2 \mu\text{M}$  bindet. Die Mutante Q768G bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit einer zehnfach erhöhten Affinität ( $12 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ). Durch die Mutation E774 zu Q774 in der EF-Hand wurde eine Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verhindert (Allen et al., 2014).



**Abbildung 15: Ribbon-Darstellung von PC2(717-792)**

Gezeigt wird die Position des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions in grün (Allen et al., 2014).

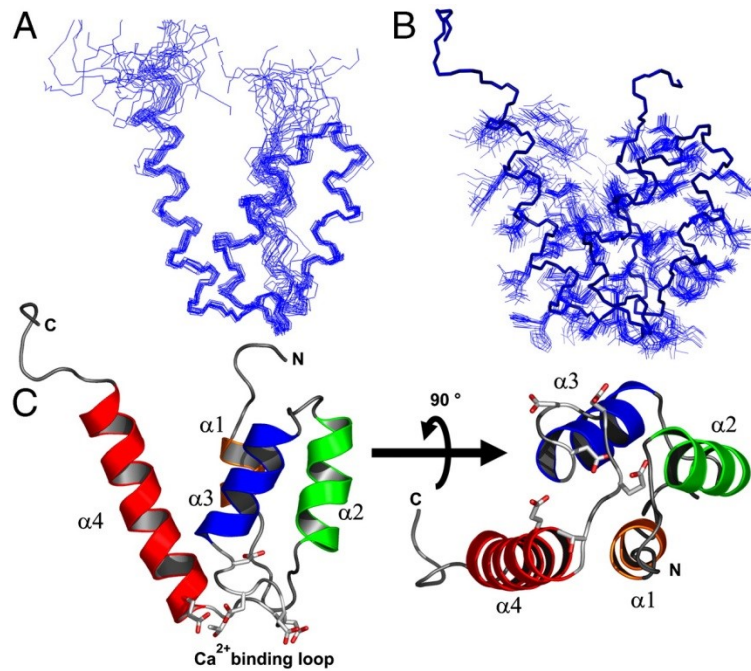


**Abbildung 16: Detaillierte Darstellung der EF-Hand von PC2(717-792)**

Gezeigt werden - in Bezug auf das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion - die Seitenkettengruppen der Aminosäuren, die an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung beteiligt sind (Allen et al., 2014).

### 1.5.1.3 PC2(720-797)

Für das 78 Aminosäuren lange Fragment PC2(720-797) wurde die Struktur (PDB: 2KQ6) von Petri et al. bestimmt (Petri et al., 2010). Petri et al. fanden mit ITC eine Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit einem  $K_D$ -Wert von  $\sim 214 \mu\text{M}$ . Zudem konnten sie eine kalziumabhängige Konformationsänderung mittels CD-Spektroskopie nachweisen, wobei sich der  $\alpha$ -Helix-Anteil durch Kalziumzugabe von 27 auf 45% erhöht. Ohne Kalzium liegt PC2(720-797) größtenteils ungefaltet vor (Petri et al., 2010).

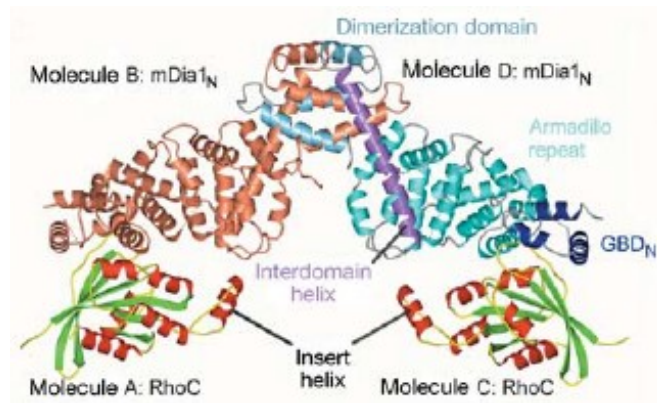


**Abbildung 17: Struktur von  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenem PC2(720-797)**

(A) Backbone-Struktur von PC2(720-797). Die besten 20 Konformere werden überlagert dargestellt. (B) Backbone Atome für das beste Modell (dunkelblau) und Seitenkettenatome für die besten 20 Konformere (blau). (C) Gesamtstruktur von PC2(720-797). Gezeigt werden die Helices  $\alpha 1$ - $\alpha 4$  (orange, grün, blau und rot) und die an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung beteiligten Seitenkettengruppen (Corey-Pauling-Koltun (CPK) sticks)(Petri et al., 2010)

### 1.5.2 mDia1(69-451)

Für das Fragment mDia1(69-451) existiert eine Kristallstruktur im Komplex mit RhoC-GppNHp (Rose et al., 2005). Das Fragment mDia1(69-451) enthält eine Dimerisierungsdomäne (DD), die GTPase-Binde-Domäne (GBD) und die Diaphanous inhibitorische Domäne (DID) (Goode and Eck, 2007; Rose et al., 2005). Aufgrund des Fehlens der DAD-Domäne im Fragment mDia1(69-451) findet keine Autoinhibition durch Binden an die DID-Domäne statt (vgl. Abbildung 9). Rose et al. beobachteten ein Dimer für mDia1(69-451) in Lösung (Rose et al., 2005). Eberhardt konnte bereits eine Interaktion von PC2(680-796) mit dem Fragment mDia1(69-451) und einen  $K_D$ -Wert von  $39.3 \pm 13.7 \mu\text{M}$  für die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Interaktion feststellen (Eberhardt, 2011).



**Abbildung 18: Gesamtstruktur des mDia<sub>N</sub>-RhoC-Komplexes**

Ribbon-Darstellung des RhoC-GppNHp-mDia<sub>N</sub>-Dimers. Bei einem mDia<sub>N</sub>-Molekül werden die Domänen farbig gekennzeichnet, das andere mDia<sub>N</sub>-Molekül wird komplett in braun dargestellt. RhoC-GppNHp-β-Faltblätter sind grün und α-Helices in rot dargestellt (Rose et al., 2005) (PDB: 1z2c).

## 2 Materialien und Geräte

### 2.1 Bakterienstämme

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme. Der Ausgangsbakterienstamm für das Fragment PC2(680-796) wurde von Prof. Dr. Witzgall, Lehrstuhl für molekulare und zelluläre Anatomie, Universität Regensburg erhalten. Die Plasmid-DNA für PC2(717-792) sowie zwei <sup>15</sup>N-gelabelte Proben wurden von Mark Allen vom MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge, United Kingdom, erhalten. Die mDia-Stämme kamen von Prof. Dr. Alfred Wittinghofer, Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie Dortmund. PC2(720-797) wurde am Lehrstuhl kloniert. Es enthielt jedoch mit den Aminosäuren GSHMASMTGGQQMGRSG einen relativ langen Rest aufgrund einer nicht optimal gewählten Schnittstelle.

Fragment	E. coli	Vektor	Resistenz	Tag	Schnittstelle
PC2(720-797)	Rosetta(DE3)pLysS	pET 28a(+)	Kanamycin	6xHis	Thrombin
PC2(680-796)	BL21(DE3)	pET 41a	Kanamycin	6xHis	Thrombin
PC2(717-792)	Rosetta(DE3)pLysS	pRSETa	Ampicillin	6xHis	TEV
mDia1(69-451)	BL21(DE3)	pGEX-4T-1	Ampicillin	GST	Thrombin

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

### 2.2 Nährmedien

#### 2.2.1 LB (Lysogeny Broth)-Medium 1L (autoklaviert) (Bertani, 1951)

Bactotryptone	10 g
Bacto Yeast	5 g
NaCl	10 g
NaOH	0.5 mM
H <sub>2</sub> O (Millipore)	Auf 1 L auffüllen

#### 2.2.2 NMM (New Minimal Medium) 1 L (steril filtriert) (Budisa et al., 1995)

Puffer	900 ml
SL-Prämix	10 ml
Glucose	4 g

Antibiotika	Nach Bedarf
$^{15}\text{N}$ ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	0.5 bzw. 1 g
Thiamin	1 mg
$\text{H}_2\text{O}$ (Millipore)	Auf 1 L auffüllen

Alternativ zu 1 mg Thiamin können 10 ml BME Vitamins 100x solution (Sigma) verwendet werden

Puffer:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7.5 g (9.4 g bei x $2\text{H}_2\text{O}$ )
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 g
$\text{NaCl}$	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	0.014 g
$\text{H}_2\text{O}$ (Millipore)	Auf 900ml auffüllen

10ml SL-Mix = Spurenelementemix-EDTA-Eisensulfat:

SL-6	1 ml
10xSL-4	0.9 ml
$\text{H}_2\text{O}$ (Millipore)	Auf 10 ml auffüllen

SL-6 Spurenelement-Mix 1 L (steril filtriert):

$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	100 mg
$\text{MnCl}_2$	30 mg
$\text{H}_3\text{BO}_3$	300
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	200 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{NiCl} \times 6 \text{H}_2\text{O}$	20 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	30 mg

H <sub>2</sub> O (Millipore)	Auf 1 L auffüllen
------------------------------	-------------------

10xSL-4 EDTA-Eisensulfat (immer frisch angesetzt):

EDTA	500 mg
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	200 mg
H <sub>2</sub> O (Millipore)	Auf 90 ml auffüllen

## 2.3 Antibiotika

Carbenicillin, Ampicillin (beide GERBU): Stammlösung: 50 mg/ml in H<sub>2</sub>O  
*Gebrauchsverdünnung 1:1000*

Kanamycin (GERBU): Stammlösung: 25 mg/ml in H<sub>2</sub>O  
*Gebrauchsverdünnung 1:1000*

Chloramphenicol (Roche): Stammlösung: 34 mg/ml in Ethanol  
*Gebrauchsverdünnung 1:500*

## 2.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden stets in der höchsten Reinheitsstufe (Analysequalität) von den Firmen Amersham, Merck, Roche, Serva, GERBU, Roth, VWR, USB, MPBiomedicals, Euriso-Top und Sigma-Aldrich bezogen und gemäß der Sicherheitsdatenblätter gelagert und verwendet.

## 2.5 Pufferlösungen

### 2.5.1 Pufferlösungen für PC2(720-797), PC2(680-796), PC2(717-792)

His-Puffer: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 Tablette EDTA-free Complete (Roche)

His-Waschpuffer: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 50 mM Imidazol pH 8.0

His-Elutionspuffer: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 300 mM Imidazol pH 8.0

Messpuffer: 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTE oder DTT

### 2.5.2 Pufferlösungen für mDia1(69-451)

Lysepuffer:	50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 5mM DTE, Proteaseinhibitor
Waschpuffer:	50 mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM DTE, Proteaseinhibitor
Elutionspuffer:	50 mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM DTE, Proteaseinhibitor, 15 mmol red. Glutathion
Endpuffer:	20 mM Tris pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM DTE

### 2.5.3 Pufferlösungen für TEV-Protease:

TEV-Lysepuffer:	20 mM Tris pH 8.0, 10 mM Imidazol pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.2% NP-40, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer: 1	20 mM Tris pH 8.0, 10 mM Imidazol pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer: 2	20 mM Tris pH 8.0, 10 mM Imidazol pH 8.0, 1 M NaCl, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Waschpuffer: 3	20 mM Tris pH 8.0, 50 mM Imidazol pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Elutionspuffer:	20 mM Tris pH 8.0, 330 mM Imidazol pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM Mercaptoethanol
TEV-Storepuffer:	20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM DTE, 10% Glycerin

## 2.6 Gele

### 2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli (Laemmli, 1970)

Sammelgel:	0,13 M Tris/HCl pH 6,8; 0,04 % SDS, 4 % Acrylamid, 1 % Ammoniumpersulfat (APS), 0,1 % N,N,N,N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)
Trenngel:	0,4 M Tris/HCl pH 8,8; 0,04 % SDS, 10-15% Acrylamid, 1 % Ammoniumpersulfat (APS), 0,1 % N,N,N,N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)
Laufpuffer:	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS
SDS-Probenpuffer:	230 mM Tris/HCl pH 6,8; 6,85 % SDS, 24 % Glycerin, 0,4 M DTE, 0,008 % Bromphenolblau
Färbelösung:	45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, 45 % (v/v) Wasser, 0,1 % (w/v) Coomassie G Brilliant Blue, 0,3 % (w/v) Coomassie B Brilliant Blue



Entfärbelösung: 20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, 70 % (v/v) Wasser

### 2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schägger (Schägger, 1987)

Sammelgel: 0,13 M Tris pH 6,8, 0,04 % SDS, 5 % Acrylamid, 1 % Ammoniumpersulfat (APS), 0,1 % N,N,N,N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)

Trenngel: 0,4 M Tris/HCl pH 8,5; 0,04 % SDS, 15-17,5 % Acrylamid, 1 % Ammoniumpersulfat (APS), 0,1 % N,N,N,N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)

Gelpuffer: 3 M Tris/HCl pH 8,45; 0,3 % SDS, 0,1 M Na<sub>3</sub>N

Anodenpuffer: 0,2 M Tris/HCl pH 8,9

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris/HCl pH 8,25; 0,1 M Tricin, 1 % SDS, 0,1 M Na<sub>3</sub>N

SDS-Probenpuffer: 230 mM Tris/HCl pH 6,8; 6,85 % SDS, 24 % Glycerin, 0,4 M DTE, 0,008 % Bromphenolblau

Färbelösung: 45 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, 45 % (v/v) Wasser, 0,1 % (w/v) Coomassie G Brilliant Blue, 0,3 % (w/v) Coomassie B Brilliant Blue

Entfärbelösung: 20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig, 70 % (v/v) Wasser

## 2.7 Enzyme

Thrombin: Merck

TEV Protease: Eigene Herstellung

Lysozym: Sigma-Aldrich

DNase I: Roche

Xho I: NEB

Bam H I: NEB

T-4 Ligase: NEB

## 2.8 Proteinstandard

PageRuler Unstained Protein Ladder (10kDa bis 200kDa)	Thermo Scientific
Dalton Mark VII – L 7 Sigma-Aldrich (14.2 bis 66 kDa)	Steinheim

## 2.9 Säulenmaterialien

26/600 Superdex 200 prep grade	GE Healthcare
26/60 Superdex 75 prep grade	GE Healthcare
16/60 Superdex 75 prep grade	GE Healthcare
Ni-NTA Superflow	Qiagen
HiTrap Benzamidine FF (High Sub)	GE Healthcare
Glutathione Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare
MBPTrap HP	GE Healthcare
Dextrin Sepharose High Performance	GE Healthcare

## 2.10 Molekularbiologische Kits

Pure Yield™ Plasmid Miniprep System	Promega
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Universal His Western Blot Kit 2.0	Clontech
pGEM-T Easy Vector System	Promega
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen

## 2.11 Verbrauchsmaterialien

Vivaspin 20 5.000 MWCO	Sartorius
Vivaspin 20 10.000 MWCO	Sartorius
Sterilfilter Steritop	Millipore 500
5 mm NMR Tube 502-7	NORELL
5 mm Shigemi Tube	SHIGEMI
Einmalküvetten	Roth
Eppendorf-Cups	VWR
Falcon-Tubes	VWR
Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 3.500/7.000 MWCO	Thermo Scientific
Dialyseschlauch ZelluTrans 3.500 MWCO	Roth

## 2.12 Geräte

Biofuge pico	Heraeus Instruments
Bruker Avance600, TXI CryoProbe	Bruker BioSpin
Bruker Avance800, TCI CryoProbe	Bruker BioSpin
Brutschrank EB 53	Juan
FPLC ÄKTA™-System, UPC 900, Frac 900	Amersham Pharmacia
Gelelektrophoresekammern	GE Healthcare
Heizblock Type QBD1	Grant
HPLC System Gold® 125 Solvent Module, System Gold® 166 Detector	Beckman Coulter
HUP440	Pressure BioSciences Inc, South Easton, MA
Inkubator AJ 100	Infors
Lyophylle Christ Alpha 1-4	B. Braun Biotech International
Magnetrührer MR3001K	Heidolph
Milliporeanlage	Millipore
pH-Elektrode Spintrode P	Hamilton
pH-Meter, Ø 32 pH Meter, Ø 340 pH/temp Meter	Beckman Coulter
Photobox für Gele	Peqlab
Promax Schüttler	Heidolph
Schlauchpumpe Minipuls 3	Abimed Gilson
Tischzentrifuge Universal 320R	Hettich
Thermocycler Mastercycler Personal	Eppendorf
Thermomixer Compact	Eppendorf
Ultraschalldesintegrator Sonifier 250/450	Branson
UV/VIS Spektrometer Lambda Bio	Perkin Elmer
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage, CP64, Sartorius PM 600	Mettler

Wasseraufbereitung

PURELAB Ultra Elga

Western-Blot-Gerät, Pierce Fast Semi-Dry Blotter

Thermo Scientific

Zentrifugen J-6B, Avanti J-20, Avanti J-25

Beckman Coulter

## 2.13 Software

pyMOL

<http://www.pymol.org>

Origin 6.0

Microcal Software Inc.

MS-Office

Microsoft

Topspin NMR

Bruker

Topspin Plot

Bruker

Auremol Portable (Version 2015/10)

<http://www.auremol.de>

Corel Draw X7

Corel Corporation

Spectra Manager 2

Jasco

Notepad++v6.6.7

<http://notepad-plus-plus.org>

Gimp 2.8

<http://www.gimp.org/>

HPLC Gold Chromatography Data System V1.7

Beckman

Äkta UNICORN Control System

Amersham

BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1.11

<http://bioedit.software.informer.com>

R

Programmiersprache für  
statistische Berechnungen  
<https://www.r-project.org/>

Chimera 1.12

<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

## 2.14 Online-Tools

pl/Mw tool

<http://web.expasy.org/>

protparam tool

<http://web.expasy.org/>

## 3 Methoden

### 3.1 Expression der Proteine

#### 3.1.1 Expression von ungelabeltem PC2(680-796), PC2(717-792), PC2 (720-797)

Der Vorkulturansatz besteht aus 200 ml LB-Medium, dem jeweiligen Antibiotikum (vgl. Tabelle 2) und einer Pipettenspitze der Glycerinkultur des jeweiligen Fragments. Er wird über Nacht bei 37 °C und 180 U/min im Schüttler inkubiert. In vier 5 L Erlmeyer-Kolben mit je 2,5 L bereits autoklaviertem LB-Medium werden am nächsten Tag sowohl das entsprechende Antibiotikum als auch 50 ml der Vorkultur zugesetzt. Optional werden 2 g/L Glucose zugegeben. Im Schüttler wird bei 37°C bis zu einer OD von 0,6-0,8 inkubiert. Dann wird durch die Zugabe der entsprechenden Menge IPTG (vgl. Tabelle 2) die Proteinexpression induziert. Diese erfolgt über Nacht bei Raumtemperatur (ca. 16 h). Am nächsten Morgen werden die Bakterienkulturen bei 4 °C und 4000 U/min für 25 min zentrifugiert und die so erhaltenen Zellpellets bei -20 °C gelagert.

Fragment	Antibiotika-Verwendung	IPTG [mM]	Expression [h]
PC2(720-797)	Kanamycin (25 mg/ml Stammlösung) 1:1000	0,4	16
PC2(680-796)	Kanamycin (25 mg/ml Stammlösung) 1:1000	0,4	16
PC2(717-792)	Ampicillin (50 mg/ml Stammlösung) 1:1000	1	16
mDia1(69-451)	Ampicillin (50 mg/ml Stammlösung) 1:1000	0,4	16
TEV-Protease	Chloramphenicol (34 mg/l Stammlösung) 1:500  Kanamycin (25 mg/ml Stammlösung) 1:1000	0,5	4

**Tabelle 2: Antibiotikaverwendung und IPTG-Konzentrationen für die Expression**

Die Antibiotika werden in der Gebrauchsverdünnung 1:1000 bzw. 1:500 verwendet (vgl. 2.3).

#### 3.1.2 Expression der <sup>15</sup>N-gelabelten PC2-Fragmente

Die Expression erfolgt analog zu 3.1.1, nur dass statt LB-Medium vom ersten Schritt an (betrifft auch die Vorkultur) NMM-Medium verwendet wird. Für <sup>15</sup>N gelabeltes Protein werden 0,5 g oder 1 g <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl pro 1 L eingesetzt (vgl. 2.2.2).

### **3.1.3 Expression der TEV-Protease**

Die Expression der TEV-Protease erfolgt analog zu 3.1.1., mit dem Unterschied, dass vier Stunden inkubiert wird und 0,5 mM IPTG verwendet wurde (vgl. Tabelle 2).

### **3.1.4 Expression von mDia1**

Die Expression von mDia1 erfolgt analog zu 3.1.1. mit den jeweiligen Antibiotika und IPTG-Konzentrationen (vgl. Tabelle 2).

## **3.2 Reinigung der Proteine**

### **3.2.1 Reinigung von PC2(680-796) und PC2(720-797)**

Die eingefrorenen Pellets aus 5 L Kultur werden in ein Becherglas gegeben und in 50-80 ml His-Puffer (vgl. 2.5) gelöst. Es wird zuerst für 10 min bei Raumtemperatur, dann für 30 min auf Eis gerührt. Daraufhin werden zum Aufschließen der Zellen je eine Spatelspitze Lysozym und DNase I zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird zusätzlich 3x 10 s mit Ultraschall behandelt wobei 30 s Pause zwischen den drei Schritten eingehalten werden. Die Ultraschallbehandlung erfolgt auf Eis. Danach wird nochmal für 30 min auf Eis gerührt. Daraufhin wird bei 4 °C und 40000 g für 45 min zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen, die Pellets verworfen. Die Überstände werden in ein Becherglas gegeben und zirkulieren bei 4 °C für 3 h mit ca. 1 ml/min über eine vorher mit His-Puffer equilibrierte Ni-NTA Superflow Säule (Säulenvolumen 15 ml). Hierbei bindet das mit einem His-Tag versehene PC2-Fragment an das Säulenmaterial. Im Folgenden wird die Säule mit drei Säulenvolumen His-Puffer und danach mit drei Säulenvolumen His-Waschpuffer gespült, um nicht oder nur schwach an die Säule bindende Substanzen auszuspülen. Dann wird mit vier Säulenvolumen His-Elutionspuffer eluiert und das Eluat gesammelt. Dem Eluat werden 2x 350 µl Thrombin (2 u/1 µl) hinzugefügt und für 6 h bei Raumtemperatur verdaut. Das Thrombin schneidet den His-Tag vom PC2-Fragment ab. Im nächsten Schritt rezirkuliert das Eluat auf Eis für 3 h über eine zuvor mit His-Elutionspuffer HiTrap Benzamidine FF (High Sub) - Säule. Diese entfernt das Thrombin aus dem Eluat und stoppt damit den Verdau. Die Benzamidine – Säule wird danach mit zehn Säulenvolumen Guanidinhydrochlorid und zehn Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gereinigt und auf Ethanol bei 4 °C gelagert. Das Eluat wird in Vivaspin-Konzentratoren bei 4 °C und 5000 g auf 2 ml aufkonzentriert und in 1-2 Eppendorf Cups übertragen. Das aufkonzentrierte Eluat wird auf eine Superdex G75 prep grade size exclusion - Säule aufgetragen, um evtl. noch vorhandene Verunreinigungen aus der Probe zu entfernen und gleichzeitig in den Messpuffer umzupuffern. Die bei diesem Prozess erhaltenen Fraktionen werden wiederum in Vivaspin-Konzentratoren bei 4°C und 5000 g auf 2 ml aufkonzentriert und in 1-2 Eppendorf Cups übertragen. Diese werden anschließend mit Flüssigstickstoff schockgefroren um Kristallbildung beim Einfrieren zu verhindern und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.2 Reinigung von PC2(717-792)**

Die eingefrorenen Pellets aus 5 L Kultur werden in ein Becherglas gegeben und in 50-80 ml His-Puffer (vgl. 2.5) gelöst. Es wird zuerst für 10 min bei Raumtemperatur, dann für 30 min auf Eis gerührt. Daraufhin werden zum Aufschließen der Zellen je eine Spatelspitze Lysozym und DNase I zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird zusätzlich 3x 10 s mit Ultraschall behandelt wobei 30 s Pause zwischen den drei Schritten eingehalten werden. Die Ultraschallbehandlung erfolgt auf Eis. Danach wird nochmal für 30 min auf Eis gerührt. Daraufhin wird bei 4 °C und 40000 g für 45 min zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen, die Pellets verworfen. Die Überstände werden in ein Becherglas gegeben und zirkulieren bei 4 °C für 3 h mit ca. 1 ml/min über eine vorher mit His-Puffer equilibrierte Ni-NTA Superflow Säule (Säulenvolumen 15 ml). Hierbei bindet das mit einem His-Tag versehene PC2-Fragment an das Säulenmaterial. Im Folgenden wird die Säule mit drei Säulenvolumen His-Puffer und danach mit drei Säulenvolumen His-Waschpuffer gespült, um nicht oder nur schwach an die Säule bindende Substanzen auszuspülen. Dann wird mit vier Säulenvolumen His-Elutionspuffer eluiert und ca. 100-150 ml Eluat gesammelt. Im Folgenden wird dem Eluat 400 µl TEV-Protease aus eigener Herstellung (vgl. 3.1.3, 3.2.4) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur der His-Tag vom Protein abverdaut. Im nächsten Schritt erfolgt über Dialyse zweimal eine Umpufferung in Messpuffer um das Imidazol aus dem Eluat zu entfernen. Somit kann das umpufferete Eluat wiederum auf die mit Messpuffer equilibrierte Ni-NTA Superflow Säule gegeben werden. Gebunden wird dieses Mal nur die His-getaggte TEV-Protease und vom Protein abverdauter His-Tag. Das Protein selbst befindet sich im Durchlauf der wiederum mit Vivaspin-Konzentratoren bei 5000 g auf 1-2 ml aufkonzentriert wird. Diese 1-2 ml werden bei Bedarf auf eine Superdex G75 prep grade size exclusion - Säule aufgetragen, um evtl. noch vorhandene Verunreinigungen aus der Probe zu entfernen. Die bei diesem Prozess erhaltenen Fraktionen werden wiederum in Vivaspin-Konzentratoren bei 4 °C und 5000 g auf 2 ml aufkonzentriert und in 1-2 Eppendorf Cups übertragen. Diese werden anschließend mit Flüssigstickstoff schockgefroren um Kristallbildung beim Einfrieren zu verhindern und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.3 Reinigung von mDia1(69-451)**

Die eingefrorenen Pellets aus 5 L Kultur werden in ein Becherglas gegeben und in 100 ml Lysepuffer (vgl. 2.5) gelöst. Es wird zuerst für 10 min bei Raumtemperatur, dann für 30 min auf Eis gerührt. Daraufhin werden zum Aufschließen der Zellen je eine Spatelspitze Lysozym und DNase I zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird zusätzlich 3x 10 s mit Ultraschall behandelt wobei 30 s Pause zwischen den drei Schritten eingehalten werden. Die Ultraschallbehandlung erfolgt auf Eis. Danach wird nochmal für 30 min auf Eis gerührt. Daraufhin wird bei 4 °C und 12000 g für 1 h zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen, die Pellets verworfen. Der Überstand wird in ein Glasgefäß überführt und das gesamte Volumen lässt man über Nacht bei 4 °C und sehr geringer Flussrate (ca. 0,5 ml/min) über eine mit Lysepuffer equilibrierte Glutathione Sepharose 4 Fast Flow – Säule rezirkulieren. Hierbei bindet der GST-Tag des Proteins an das Säulenmaterial. Anschließend wird mit zehn Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Daraufhin werden mit Elutionspuffer ca. 100 ml eluiert. Darin befindet sich das Protein. Die Säule wird mit zwei Säulenvolumen Waschpuffer und zwei Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gespült und auf Ethanol gelagert. Im nächsten Schritt erfolgt der Abverdau des GST-Tags mittels 2x 350 µl Thrombin (2u/1 µl) bei 4 °C über Nacht. Das Thrombin wird im Anschluss daran mit Hilfe einer zuvor mit Elutionspuffer equilibrierten HiTrap Benzamidine FF (High Sub) – Säule entfernt. Dabei lässt man wieder das

gesamte Volumen bei niedriger Flussrate für ca. 3 h bei 4 °C über die Säule zirkulieren. Die Benzamidine – Säule bindet das Thrombin und wird danach mit zehn Säulenvolumen Guanidinhydrochlorid und zehn Säulenvolumen H<sub>2</sub>O gereinigt und auf Ethanol bei 4 °C gelagert. Das gesamte Volumen wird daraufhin mittels Vivaspin-Konzentratoren (MW: 10000) auf 1-2 ml einreduziert und auf eine mit Endpuffer equilibrierte Superdex Säule 16/600 200 – Säule gegeben. Die erhaltenen Fraktionen werden wiederum in Vivaspin-Konzentratoren bei 4 °C und 5000 g auf 2 ml aufkonzentriert und in 1-2 Eppendorf Cups übertragen. Diese werden anschließend mit Flüssigstickstoff schockgefroren um Kristallbildung beim Einfrieren zu verhindern und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.4 Reinigung der TEV-Protease**

Als Erstes wird das Zellpellet in 50-80 ml TEV-Lysepuffer gelöst. Es wird zuerst für 10 min bei Raumtemperatur, dann für 30 min auf Eis gerührt. Daraufhin werden zum Aufschließen der Zellen je eine Spatelspitze Lysozym und DNase I zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wird zusätzlich 3x 10 s mit Ultraschall behandelt wobei 30 s Pause zwischen den 3 Schritten eingehalten werden. Die Ultraschallbehandlung erfolgt auf Eis. Danach wird nochmal für 30 min auf Eis gerührt. Im nächsten Schritt wird bei 4 °C und 17000 g für 45min zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen, die Pellets verworfen. Der Überstand wird zweimal auf eine vorher mit TEV-Lysepuffer equilibrierte Ni-NTA Superflow Säule aufgetragen. Im Anschluss daran wird mit jeweils vier Säulenvolumen der TEV-Waschpuffer 1-3 gespült, daraufhin mit TEV-Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wird milliliterweise in Eppendorf Cups abgenommen und mittels Bradford-Lösung auf ihren Proteingehalt getestet. Die proteinhaltigen Fraktionen werden gepoolt und mit Vivaspin-Konzentratoren (MW 5000) aufkonzentriert. Das konzentrierte Proteingemisch wird auf eine Superdex G75 prep grade size exclusion - Säule aufgetragen, um evtl. noch vorhandene Verunreinigungen aus der Probe zu entfernen und gleichzeitig in den TEV-Storepuffer (vgl. Pufferlösungen für TEV-Protease:) umzupuffern. Die bei diesem Prozess erhaltenen Fraktionen werden wiederum in Vivaspin-Konzentratoren bei 4 °C und 5000 g auf 1-2 ml aufkonzentriert und in 1-2 Eppendorf Cups übertragen. Die Konzentration der TEV-Protease wird mittels UV/VIS Spektrometer bei OD 280 bestimmt. Die Eppendorf Cups mit TEV-Protease werden anschließend mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **3.2.5 Dialyse von Proteinen**

Um verschiedene später für Titrationsen verwendete Proteine in exakt den gleichen Messpuffer zu überführen, wurde mit den Proteinen, die sich meistens noch im Aufreinigungspuffer befanden, eine Dialyse durchgeführt. Die Dialyse wurde mittels Dialysekassetten durchgeführt, wobei die verwendete Porengröße der Dialysemembran immer von der Proteingröße des Proteins abhängt. Vor der Dialyse werden die Kassetten einige Minuten lang in H<sub>2</sub>O (Millipore) eingelegt, darauf in für einige Minuten in den verwendeten Puffer. Im Anschluss daran wird die Proteinlösung in die Dialysekassette injiziert und für mindestens vier Stunden gegen den Puffer dialysiert. Dieser Schritt wurde mindestens einmal wiederholt. Bei einem Probenvolumen von 0,5-1,5 ml betrug das Volumen des Dialysepuffers mindestens 250 ml. Für Dialysen mit größeren Probenvolumen im Verlauf einer



Proteinaufreinigung wurden Dialyseschläuche verwendet. Auch das Volumen des Puffers, gegen den dialysiert wurde, wurde entsprechend angepasst.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien für eine nachfolgende Sequenzierung oder Transformation wurde das Pure Yield™ Plasmid Miniprep System verwendet (Ausbeute ca. 50-150 ng/μl). Um höhere Plasmid-DNA-Konzentrationen zu isolieren, wurde mit größeren Bakterienkulturvolumina gearbeitet und das Pure Yield™ Plasmid Midiprep System Promega benutzt (Ausbeute ca. 600 ng/μl).

#### 3.3.2 Transformation von Plasmid-DNA und Herstellung der Glycerinkulturen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in Expressionsstämme werden 100 μl kompetente Zellen mit 2-5 μl Plasmid-DNA (50-150 ng/μl) in ein Eppendorf Cup gegeben und durch kurzes leichtes Schnipsen vermischt. Der Ansatz wird für ca. 8 min auf Eis stengelassen, danach erfolgt die Hitzeschockbehandlung für 45-90 s bei 42 °C. Danach wird der Ansatz wiederum für 5 min auf Eis gestellt. Im Folgenden werden dem Ansatz 500 μl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C geschüttelt und inkubiert. Der Ansatz wird aufgeteilt und auf zwei mit dem passenden Antibiotikum versetzten LB-Platten ausplattiert. Die Platten werden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C platziert und am nächsten Tag werden ausgewählte Klone gepickt. Diese werden zur Herstellung der Glycerinkulturen verwendet. Dazu lässt man die Klone in 3 ml LB-Medium anwachsen und versetzt anschließend 700 μl Bakterienkultur mit 300 μl 87% Glycerin. Die so hergestellten Glycerinkulturen werden bei -80 °C gelagert.

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen mittels UV-Absorption

Die Aminosäure Tryptophan absorbiert ebenso wie in geringerem Maße Tyrosin und Phenylalanin Licht einer Wellenlänge von 280 nm. Die Konzentration von Proteinen lässt sich somit aus der Absorption bei 280 nm bestimmen (Gill and von Hippel, 1989; Pace et al., 1995; Stoscheck, 1990). Dazu wird die Proteinlösung mit Milliporewasser verdünnt und die Absorption bei 280 nm gemessen. Als Referenzwert dient die Absorption bei 280 nm einer Probe reinen Milliporewassers. Der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins wird über seine Aminosäuresequenz mit dem Online-Tool ProtParam (2.14) berechnet (Gill and von Hippel, 1989; Pace et al., 1995; Stoscheck, 1990). Somit kann über das Lambert-Beersche-Gesetz die Proteinkonzentration berechnet werden.

$$A(280\text{ nm}) = \varepsilon(280\text{ nm}) \cdot c \cdot d$$

**Formel 1: Lambert Beersches Gesetz**

A = Absorbanz,  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration des Proteins, d = Schichtdicke der Küvette.

### **3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli**

Zu bestimmten Aufreinigungsschritten und immer nach dem letzten Aufreinigungsschritt, wurden die Proteinfractionen zur weiteren Überprüfung auf ein Polyacrylamidgel gegeben und eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Für Fragmente, die eine Molekülmasse von 15 kD oder mehr aufweisen empfiehlt sich die SDS-PAGE nach Lämmli (Laemmli, 1970). Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine in ihrer Ladung maskiert. Sie erhalten hierbei eine negative Gesamtladung, die direkt proportional zu ihrer Molekülmasse ist. Somit können die Proteine über ihre ladungsabhängige Laufgeschwindigkeit nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Dazu werden 6 µl 4x SDS-Probenpuffer zu 24 µl Proteinprobe hinzugefügt, kurz zentrifugiert, bei 103°C für 5-10 min im Heizblock erhitzt und wiederum kurz abzentrifugiert. Die Gelkammer wird zusammengebaut und mit Laufpuffer befüllt. Die Taschen des Polyacrylamidgels werden nun mit jeweils 12 µl der denaturierten Proteinproben befüllt. Zusätzlich werden 10 µl des Proteinstandards aufgetragen. Es wird bei einer Stromstärke von 40 mA für ca. 50 min aufgetrennt. Im Anschluss wird das Polyacrylamidgel mit SDS-Färber bedeckt, für 30 s in der Mikrowelle aufgekocht und für mindestens 30 min geschwenkt. Hierauf wird es zweimal mit Coomassie Entfärber bedeckt, wieder für 30 s in der Mikrowelle aufgekocht und ca. 1 h geschwenkt. Die entfärbten Gele wurden eingescannt. Für verwendete Materialien vgl. 2.6.1.

### **3.4.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schägger**

Für Proteine mit einer Molekülmasse kleiner als 15 kDa wird die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Schägger verwendet (Schägger, 1987). Hierbei werden im Vergleich zur Polyacrylamidgelelektrophorese nach Lämmli leicht veränderte Gelzusammensetzungen und Puffer benutzt (vgl. 2.6.2). Aufgetrennt wird bei 40 mA für ca. 50 min. Probenzubereitung, Färbung und Entfärbung verlaufen analog zu Lämmli.

## **3.5 Kernspinresonanzspektroskopie**

### **3.5.1 Probenpräparation**

Die aufgereinigten Proben werden zusammen mit den zugesetzten Komponenten auf ein Gesamtvolumen von 500 µl, 600 µl oder 660 µl gebracht. Als Referenz in der Probe wird DSS (wird vorher in D<sub>2</sub>O gelöst) in den Konzentrationen 50 µM, 100 µM oder 200 µM verwendet. Außerdem enthält die Probe 5% oder 10% D<sub>2</sub>O für das Lock-Signal. Die Proben werden einige Male invertiert, mit dem Spinner in das Spektrometer eingesetzt und vor Start der Messung für mindestens 5 min auf die Messtemperatur equilibriert.

### **3.5.2 Lyophilisieren und D<sub>2</sub>O-Austausch**

Für pH-Titrationen und Kalziumtitrationen werden die Proben nach der Aufreinigung fünfmal lyophilisiert, wobei nach jedem Lyophilisierungsschritt mit D<sub>2</sub>O exakt auf das vorherige Volumen aufgefüllt wird und die Probe mindestens sechs Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C stengelassen wird, bevor der nächste Lyophilisierungsschritt erfolgt. Ziel ist ein möglichst kompletter D<sub>2</sub>O-Austausch, so dass die Probe am Ende in 99.9% reinem D<sub>2</sub>O vorliegt. Dies ist

notwendig, um die Protonen der Aromaten im Spektrum ohne Überlagerung durch die Amidprotonensignale zu detektieren.

### **3.5.3 pH-Titrationsen von PC2**

#### **3.5.3.1 Allgemeines**

Um im Spektrum eine Überlagerung der Protonen der Aromaten durch die Amidprotonensignale zu verhindern, wurde ungelabeltes PC2 wie in 3.5.2 beschrieben lyophilisiert und ein D<sub>2</sub>O-Austausch durchgeführt.

#### **3.5.3.2 pH-Titrationsen von PC2 ohne Ca<sup>2+</sup>**

Die Probe wurde ohne Kalzium aufgereinigt. Um natürlicherweise vorkommende Kalziumionen aus der Probe zu entfernen, wurde in Schritten EDTA zugegeben, bis das bereits von Schumann et al. als Marker für die Kalziumbindung identifizierte Signal F738H<sup>6</sup> nicht mehr sichtbar war (Schumann et al., 2009a). Nach EDTA-Zugabe wird davon ausgegangen, dass sich keine freien Kalziumionen mehr in der Probe befinden. Im Folgenden wurde durch die Zugabe möglichst geringer Volumina verschieden konzentrierter DCl- und NaOD-Lösungen der passende pH-Wert für den Start der Titration eingestellt.

#### **3.5.3.3 pH-Titrationsen von PC2 mit Ca<sup>2+</sup>**

Um die pH-Titration für PC2 bei Ca<sup>2+</sup>-Sättigung durchzuführen, wurde solange in Schritten in D<sub>2</sub>O gelöstes CaCl<sub>2</sub> zugegeben, bis das Integral des bereits von Schumann et al. als Marker für die Kalziumbindung identifizierte Signal F738H<sup>6</sup> nicht mehr weiter zunimmt und von einer Sättigung der EF-Hände von PC2 mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen ausgegangen werden konnte (Schumann et al., 2009a). Im Folgenden wurde durch die Zugabe möglichst geringer Volumina verschieden konzentrierter DCl- und NaOD-Lösungen der passende pH-Wert für den Start der Titration eingestellt.

#### **3.5.3.4 Durchführung**

Die Probe wird bei jedem Titrationsschritt vom NMR-Röhrchen in ein Eppendorf Cup überführt. Um die Probe auf den gewünschten pH-Wert zu bringen, wird NaOD bzw. DCl statt NaOH und HCl zugeben, um kein H<sub>2</sub>O in Probe einzubringen. Nach Eichung der Temperatur, shimmen, tunen, matchen, Bestimmung des O1-Offsets für die Wasserunterdrückung, des 90°-Pulses und des receiver gains wird ein eindimensionales 1D-<sup>1</sup>H-NOESY-Spektrum aufgenommen. Dazu wird das Pulsprogramm *noesygppr1D* verwendet (Vögeli, 2014). Dieses Vorgehen wird für jeden Titrationsschritt wiederholt. Die Darstellung der Spektren erfolgt im Programm *Bruker TopSpin 3.2*.

#### **3.5.3.5 Prozessierung der Spektren**

Die Spektren werden mit Hilfe des Programms *Bruker TopSpin 3.2*, mit dem auch die Akquisition der Spektren erfolgte, prozessiert. Hierbei werden die Spektren zuerst exponentiell mit der gewählten Linienverbreiterung gefiltert. Daraufhin werden Phase und Baseline des Spektrums

korrigiert. Danach erfolgt die Eichung der Spektren auf das DSS-Signal (DSS dient als Referenz bei 0 ppm). Die Spektren werden in *TopSpinPlot* als *postscript*-Datei gespeichert und im Grafikprogramm *Corel Draw X7* beschriftet und farblich aufbereitet.

### 3.5.3.6 Auswertung der Spektren

Die chemischen Verschiebungen der Signale werden gegen den pH-Wert aufgetragen. Die Kurvenverläufe werden im Programm *Origin 6.0* mittels Formel 2: für einen und mittels Formel 3 für zwei pK-Werte gefittet.

$$\delta = \delta_{HA} + (\delta_{A^-} - \delta_{HA}) \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}}$$

#### Formel 2: Berechnung des pK-Wertes

$\delta$  chemische Verschiebung,  $\delta_{HA}$  chemische Verschiebung der vollprotonierten Form,  $\delta_{A^-}$  chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form, pK Säurekonstante (Hausser, K.H. and Kalbitzer, H.R., 1991).

$$\delta = \delta_0 + \frac{\delta_1 \cdot 10^{(pH-pK_1)} + \delta_2 \cdot 10^{(2pH-pK_1-pK_2)}}{1 + 10^{(pH-pK_1)} + 10^{(2pH-pK_1-pK_2)}}$$

#### Formel 3: Berechnung für zwei pK-Werte

$\delta$  chemische Verschiebung,  $\delta_0$  chemische Verschiebung der vollprotonierten Form,  $\delta_1$  chemische Verschiebung der halbprotonierten Form,  $\delta_2$  chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form, pK<sub>1</sub> und pK<sub>2</sub> Säurekonstanten (Akasaka and Matsuki, 2015).

## 3.5.4 CaCl<sub>2</sub>-Titrationsen von PC2

### 3.5.4.1 Allgemeines

Um im Spektrum eine Überlagerung der Protonen der Aromaten durch die Amidprotonensignale zu verhindern, wurde ungelabeltes PC2 wie in 3.5.2 beschrieben lyophilisiert und ein D<sub>2</sub>O-Austausch durchgeführt.

### 3.5.4.2 Durchführung

Die Probe wurde ohne Kalzium aufgereinigt. Um natürlicherweise vorkommende Kalziumionen aus der Probe zu entfernen, wurde in Schritten EDTA zugegeben, bis das bereits von Schumann et al. als Marker für die Kalziumbindung identifizierte Signal F738 H<sup>δ</sup> nicht mehr sichtbar war (Schumann et al., 2009a). Nach EDTA-Zugabe wird davon ausgegangen, dass sich keine freien Kalziumionen mehr in der Probe befinden. Im Folgenden wurde durch die Zugabe möglichst geringer Volumina verschieden konzentrierter DCl- und NaOD-Lösungen der passende pH-Wert für den Start der Titration eingestellt. Im Verlauf der Titration wird der ungelabelten PC2-Probe in Schritten CaCl<sub>2</sub> zugesetzt. Es werden im Vorfeld der Messungen verschieden konzentrierte CaCl<sub>2</sub>-Lösungen (0,01-1 mM) in D<sub>2</sub>O erstellt, um die Volumenzunahme und damit die Verdünnung der Probe während der Titration möglichst gering zu halten. Der pH-Wert wird während der CaCl<sub>2</sub>-Titration mit einer langen pH-Elektrode direkt im NMR-Röhrchen kontrolliert. Bei der pH-Messung ist darauf zu achten, kein H<sub>2</sub>O in die Probe einzuschleusen. Nach Eichung der Temperatur, shimmen, tunen, matchen, Bestimmung des O1-

Offsets für die Wasserunterdrückung, des 90°-Pulses und der Empfängerverstärkung wird ein eindimensionales 1D-<sup>1</sup>H -NOESY-Spektrum aufgenommen. Dazu wird das Pulsprogramm *noesygppr1D* verwendet (Vögeli, 2014). Dieses Vorgehen wird für jeden Titrationschritt wiederholt. Die Darstellung der Spektren erfolgt im Programm *Bruker TopSpin 3.2*.

### 3.5.4.3 Prozessierung der Spektren

Die Spektren werden mit Hilfe des Programms *Bruker TopSpin 3.2*, mit dem auch die Akquisition der Spektren erfolgte, prozessiert. Hierbei werden die Spektren zuerst exponentiell mit der gewählten Linienverbreiterung gefiltert. Daraufhin werden Phase und Baseline des Spektrums korrigiert. Danach erfolgt die Eichung der Spektren auf das DSS-Signal (DSS dient als Referenz bei 0 ppm). Die Spektren werden in *TopSpinPlot* als *postscript*-Datei gespeichert und im Grafikprogramm *Corel Draw X7* beschriftet und farblich aufbereitet.

### 3.5.4.4 Auswertung der Spektren

Um die Affinitäten für Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu ermitteln, werden die Änderungen der Signalvolumina bzw. der chemischen Verschiebungen der Signale gegen die CaCl<sub>2</sub>-Konzentration aufgetragen. Die Signalvolumina werden auf das Integral des DSS-Signals referenziert. Die Kurvenverläufe werden mit dem Programm *Origin 6.0* gefittet und nach Schumann et al. ausgewertet (Schumann et al., 2009a). Formel 4 und Formel 5 zeigen die Fit-Funktion unter Annahme nur einer Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle im Protein. Formel 4 wird für die Berechnung der Ca<sup>2+</sup>-Affinitäten anhand der Signalvolumina verwendet und Formel 5 dient analog dazu zur Berechnung anhand der chemischen Verschiebungsänderungen (Kachel et al., 2003; Schumann et al., 2009a).

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{P-L}}{2c_p^{total}} \left( (c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^1) - \sqrt{(c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^1)^2 - 4 \cdot (c_p^{total} \cdot c_L^{total})} \right) + \Delta I_0$$

**Formel 4: Fit-Funktion für einen Ca<sup>2+</sup>-Bindungsplatz anhand der Änderung des Signalvolumens**

$c_p^{total}$  und  $c_L^{total}$  sind definiert als Gesamtkonzentrationen des Proteins bzw. des Liganden (Ca<sup>2+</sup>),  $\Delta I$  als  $I - I_0$ ,  $\Delta I_0$  als  $I_P - I_0^1$  und  $\Delta I_{P-L}$  als  $I_{P-L} - I_P$ .  $I_0$ ,  $I_P$  und  $I_{P-L}$  sind die Signalvolumina bei der niedrigsten Ligandenkonzentration, in Abwesenheit des Liganden und bei Sättigung mit dem Liganden.  $K_D^1$  ist der durch den Fit ermittelte K<sub>D</sub>-Wert der betrachteten Bindungsstelle für Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Bei der Messung von langsamen Austauschprozessen in der 1-D-NMR-Spektroskopie ist das Signalvolumen in Abwesenheit des Liganden gleich null (Schumann et al., 2009a).

$$\Delta \delta^1 = \frac{\Delta \delta_{P-L}^1}{2c_p^{total}} \left( (c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^1) - \sqrt{(c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^1)^2 - 4 \cdot (c_p^{total} \cdot c_L^{total})} \right) + \Delta \delta_0^1$$

**Formel 5: Fit-Funktion für einen Ca<sup>2+</sup>-Bindungsplatz anhand der chemischen Verschiebungsänderung des Signals**

$c_p^{total}$  und  $c_L^{total}$  sind definiert als Gesamtkonzentrationen des Proteins bzw. des Liganden (Ca<sup>2+</sup>),  $\Delta \delta^1$  als  $\delta^1 - \delta_0^1$ ,  $\Delta \delta_0^1$  als  $\delta_P^1 - \delta_0^1$  und  $\Delta \delta_{P-L}^1$  als  $\delta_{P-L}^1 - \delta_P^1$ .  $\delta_0^1$ ,  $\delta_P^1$  und  $\delta_{P-L}^1$  sind die chemischen Verschiebungen bei der niedrigsten Ligandenkonzentration, in Abwesenheit des Liganden und bei Sättigung mit dem Liganden.  $\Delta \delta_0^1$  ist ein zusätzlicher Fitparameter, wenn bei Titrationsreihen Spektren bei Abwesenheit des Liganden nicht vorhanden sind.  $K_D^1$  ist der durch den Fit ermittelte K<sub>D</sub>-Wert der betrachteten Bindungsstelle für Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Schumann et al., 2009a).

Formel 6 und Formel 7 nach Schumann beziehen die Annahme eines zweiten Bindungsplatzes für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit ein (Schumann et al., 2009a). Die Definition der Variablen erfolgte analog zu Formel 4 und Formel 5.  $K_D^1$  und  $K_D^2$  zeigen die  $K_D$ -Werte für den ersten und zweiten  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsplatz an. Im Prinzip müssten beide Gleichungen simultan gelöst werden. In der Praxis wird jedoch in *Origin 6.0* ein iteratives Verfahren verwendet.

$$\begin{aligned} & \Delta I^1 \\ &= \frac{\Delta I_{P-L}^1}{2c_p^{total}} \left( \left( c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^1 - c_p^{total} \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} \right) \right. \\ & \quad \left. - \sqrt{\left( c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^1 - c_p^{total} \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} \right)^2 - 4 \cdot \left[ c_p^{total} \cdot \left( c_L^{total} - c_p^{total} \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} \right) \right]} \right) \\ & \quad + \Delta I_0^1 \end{aligned}$$

**Formel 6: Fit-Funktion für den ersten der zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsplätze**

Die Parameter wurden analog zu Formel 4 und Formel 5 definiert. Die Hochgestelle <sup>1</sup> bzw. <sup>2</sup> zeigt die für den Parameter betrachtete Bindungsstelle 1 bzw. 2 an.  $K_D^1$  ist der durch den Fit ermittelte  $K_D$ -Wert der ersten Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Schumann et al., 2009a).

$$\begin{aligned} & \Delta \delta^2 \\ &= \frac{\Delta \delta_{P-L}^2}{2c_p^{total}} \left( \left( c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^2 - c_p^{total} \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} \right) \right. \\ & \quad \left. - \sqrt{\left( c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^2 - c_p^{total} \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} \right)^2 - 4 \cdot \left[ c_p^{total} \cdot \left( c_L^{total} - c_p^{total} \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} \right) \right]} \right) \\ & \quad + \Delta \delta_0^2 \end{aligned}$$

**Formel 7: Fit-Funktion für den zweiten der zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsplätze**

Die Parameter wurden analog zu Formel 4 und Formel 5 definiert. Die Hochgestelle <sup>1</sup> bzw. <sup>2</sup> zeigt die für den Parameter betrachtete Bindungsstelle 1 bzw. 2 an.  $K_D^2$  ist der durch den Fit ermittelte  $K_D$ -Wert der zweiten Bindungsstelle für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Schumann et al., 2009a).

Formel 8, Formel 9 und Formel 10 stellen eine Erweiterung der Formeln für zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsplätze nach Schumann et al. dar und beziehen die Annahme eines dritten Bindungsplatzes mit ein (Schumann et al., 2009a). Die Definition der Variablen erfolgte wiederum analog zu Formel 4 und Formel 5.  $K_D^1$ ,  $K_D^2$  und  $K_D^3$  zeigen die  $K_D$ -Werte für die drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsplätze an. Im Prinzip müssten alle drei Gleichungen simultan gelöst werden. In der Praxis wird jedoch in *Origin 6.0* ein iteratives Verfahren verwendet.

$$\Delta I^1 = \frac{\Delta I_{P-L}^1}{2c_p^{total}} \left( \left( c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^1 - c_p^{total} \left( \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} + \frac{\Delta I^3 + \Delta I_0^3}{\Delta I_{P-L}^3 + \Delta I_0^3} \right) \right) \right. \\ \left. - \sqrt{ \left( c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^1 - c_p^{total} \left( \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} + \frac{\Delta I^3 + \Delta I_0^3}{\Delta I_{P-L}^3 + \Delta I_0^3} \right) \right)^2 - 4 \cdot \left[ c_p^{total} \cdot \left( c_L^{total} - c_p^{total} \left( \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} + \frac{\Delta I^3 + \Delta I_0^3}{\Delta I_{P-L}^3 + \Delta I_0^3} \right) \right) \right] } \right) \\ + \Delta I_0^1$$

**Formel 8: Fit-Funktion für den ersten der drei Ca<sup>2+</sup>-Bindungsplätze**

Die Parameter wurden analog zu Formel 4 und Formel 5 definiert. Die Hochgestelle <sup>1</sup>, <sup>2</sup> bzw. <sup>3</sup> zeigt die für den Parameter betrachtete Bindungsstelle 1, 2 bzw. 3 an.  $K_D^1$  ist der durch den Fit ermittelte  $K_D$ -Wert der ersten Bindungsstelle für Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Schumann et al., 2009a).

$$\Delta \delta^2 = \frac{\Delta \delta_{P-L}^2}{2c_p^{total}} \left( \left( c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^2 - c_p^{total} \left( \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} + \frac{\Delta I^3 + \Delta I_0^3}{\Delta I_{P-L}^3 + \Delta I_0^3} \right) \right) \right. \\ \left. - \sqrt{ \left( c_p^{total} + c_L^{total} + K_D^2 - c_p^{total} \left( \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} + \frac{\Delta I^3 + \Delta I_0^3}{\Delta I_{P-L}^3 + \Delta I_0^3} \right) \right)^2 - 4 \cdot \left[ c_p^{total} \cdot \left( c_L^{total} - c_p^{total} \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} \right) \right] } \right) \\ + \Delta \delta_0^2$$

**Formel 9: Fit-Funktion für den zweiten der drei Ca<sup>2+</sup>-Bindungsplätze**

Die Parameter wurden analog zu Formel 4 und Formel 5 definiert. Die Hochgestelle <sup>1</sup>, <sup>2</sup> bzw. <sup>3</sup> zeigt die für den Parameter betrachtete Bindungsstelle 1, 2 bzw. 3 an.  $K_D^2$  ist der durch den Fit ermittelte  $K_D$ -Wert der zweiten Bindungsstelle für Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Schumann et al., 2009a).

$$\Delta I^3 = \frac{\Delta I_{P-L}^3}{2c_P^{total}} \left( \left( c_P^{total} + c_L^{total} + K_D^3 - c_P^{total} \left( \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} + \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} \right) \right) \right. \\ \left. - \sqrt{ \left( c_P^{total} + c_L^{total} + K_D^3 - c_P^{total} \left( \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} + \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} \right) \right)^2 - 4 \cdot \left[ c_P^{total} \cdot \left( c_L^{total} - c_P^{total} \left( \frac{\Delta \delta^2 + \Delta \delta_0^2}{\Delta \delta_{P-L}^2 + \Delta \delta_0^2} + \frac{\Delta I^1 + \Delta I_0^1}{\Delta I_{P-L}^1 + \Delta I_0^1} \right) \right) \right] } \right) \\ + \Delta I_0^3$$

**Formel 10: Fit-Funktion für den dritten der drei Ca<sup>2+</sup>-Bindungsplätze**

Die Parameter wurden analog zu Formel 4 und Formel 5 definiert. Die Hochgestelle <sup>1</sup>, <sup>2</sup> bzw. <sup>3</sup> zeigt die für den Parameter betrachtete Bindungsstelle 1, 2 bzw. 3 an.  $K_D^3$  ist der durch den Fit ermittelte  $K_D$ -Wert der dritten Bindungsstelle für Ca<sup>2+</sup>-Ionen (Schumann et al., 2009a).

### 3.5.5 Diffusionsmessungen an PC2

#### 3.5.5.1 Allgemeines

Es werden Diffusionsmessungen (diffusion-ordered spectroscopy, DOSY) an verschiedenen PC2-Fragmenten unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, um Aussagen über den Aggregationszustand von PC2 treffen zu können. Die durch die Diffusionsmessungen ermittelten scheinbaren Molekülmassen wurden mit den mit Hilfe des pl/Mw-tools (2.14) errechneten theoretischen Molekülmassen abgeglichen und so auf den Aggregationszustand des Proteins geschlossen.

#### 3.5.5.2 Durchführung

Für die Diffusionsmessungen wird das Pulsprogramm *diffu-oneshot* benutzt (Pelta et al., 2002). Nach Eichung der Temperatur, shimmern, tunen, matchen, Bestimmung des O1-Offsets für die Wasserunterdrückung, des 90°-Pulses und der Empfängerverstärkung wird nach Eingabe des Befehls *dosy* in die Befehlszeile des Programms *Bruker TopSpin 3.2* die Gradientenstärke und Anzahl der Gradientenstufen festgelegt und die Messung gestartet. Um die Stabilität des Gradienten zu testen, wird vor der eigentlichen Messung der Proteinprobe die Messung an einer 20 %-igen auspolymerisierten Polyacrylamidprobe durchgeführt (D<sub>2</sub>O für das Lock-Signal wurde zuvor zugesetzt). Ist kein Signalabfall zu beobachten, ist der Gradient stabil. Auspolymerisiertes Polyacrylamid wird zum Test des Gradienten verwendet, da es keine beweglichen Teilchen enthält.

#### 3.5.5.3 Prozessierung der Spektren

Die Spektren werden in dem Programm *Bruker TopSpin 3.2*, mit dem auch die Aquisition der Spektren erfolgte, mit dem Befehl *xf2* prozessiert. Aus dem erhaltenen fouriertransformierten



Pseudo-2D-Spektrum werden mit Hilfe des Befehls *splitrsrcr* die einzelnen 1-D-Spektren extrahiert. Die 1-D-Spektren werden nochmals einzeln exponentiell mit einer Linienverbreiterung von 2 Hz gefiltert. Daraufhin werden Phase und Baseline korrigiert. Danach erfolgt die Eichung der 1-D-Spektren auf das DSS-Signal (DSS dient als Referenz bei 0 ppm).

### 3.5.5.4 Auswertung der Spektren

In einer Lösung mit der Viskosität  $\eta$  bei einer absoluten Temperatur  $T$ , ist die Diffusionskonstante  $D_i$  einer Verbindung  $S_i$  mit einem hydrodynamischen Radius  $R_{H,i}$  gegeben durch die Stokes-Einstein-Beziehung, wobei  $k_B$  die Boltzmannkonstante ist (Munte et al., 2008):

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{H,i}}$$

#### Formel 11: Stokes-Einstein-Gleichung

$D_i$  Diffusionskoeffizient,  $R_{H,i}$  hydrodynamischer Radius,  $T$  Temperatur,  $\eta$  dynamische Viskosität,  $k_B$  Boltzmannkonstante

Der hydrodynamische Radius  $R_{H,i}$  ist definiert als der Radius einer Kugel mit einem Volumen  $V_{H,i}$ , die dieselbe Diffusionskonstante  $D_i$  ergibt. Für eine Verbindung  $S_i$  mit dem effektiven Volumen  $f_i V_i$ , wobei  $f_i$  der charakteristische Formfaktor ist, wird Formel 11 zu (Munte et al., 2008):

$$D_i = \frac{k_B T}{3\eta \sqrt[3]{6\pi^2}} \frac{1}{\sqrt[3]{f_i V_i}}$$

#### Formel 12: Stokes-Einstein-Gleichung mit Formfaktor

Unter Annahme desselben Formfaktors für zwei unterschiedliche Verbindungen  $S_i$  und  $S_1$  kann das unbekannte hydrodynamische Verhältnis  $R_{H,i}$  der Verbindung  $S_i$  durch das bekannte hydrodynamische Verhältnis  $R_{H,1}$  der Verbindung  $S_1$  errechnet werden (Munte et al., 2008):

$$R_{H,i} = R_{H,1} \frac{D_1}{D_2}$$

#### Formel 13: Beziehung Diffusionskonstante zu hydrodynamischen Radius

Dementsprechend kann, wenn die Molekülmasse  $M_1$  einer Verbindung bekannt ist und unter Annahme gleicher Dichte für beide Verbindungen, die Masse  $M_i$  einer Verbindung  $S_i$  erhalten werden durch (Munte et al., 2008):

$$M_i = M_1 \left( \frac{D_1}{D_2} \right)^3$$

#### Formel 14: Beziehung Diffusionskonstante zu Molekülmasse

Die zufällige Bewegung von Molekülen in Lösung hängt vom hydrodynamischen Radius ab. Die Diffusionskonstanten  $D_i$  werden experimentell durch Diffusionsmessungen erhalten, da die

Signalintensität  $I(G_{rel})$  in Abhängigkeit der Gradientenstärke gegeben ist durch (Munte et al., 2008):

$$\frac{I(G_{rel})}{I_{ref}} = e^{-C \cdot G_{rel}^2}$$

**Formel 15: Fit-Funktion für Diffusionsmessungen**

$I$  Signalintensitäten,  $I_{ref}$  Anfangssignalintensität,  $G_{rel}$  relative Gradientenstärken,  $C$  DOSY-Konstante bzw. Fit Parameter.

Der Fit-Parameter  $C$  ist proportional zum Diffusionskoeffizienten und dieser ist umgekehrt proportional zum hydrodynamischen Radius (Munte et al., 2008).

$$C = \gamma^2 \cdot G_{max}^2 \cdot G_{shape}^2 \cdot \delta^2 \cdot \left( \Delta + \delta \frac{\alpha^2 - 2}{6} + \tau \frac{\alpha^2 - 1}{2} \right) \cdot D$$

**Formel 16: DOSY-Konstante C für das Pulsprogramm diffu-oneshot**

$\gamma$  gyromagnetisches Verhältnis,  $G_{max}$  absolute Gradientenstärke,  $G_{shape}$  Gradientenformfaktor,  $\delta$  Gradientenpulslänge,  $\Delta$  Diffusionszeit,  $\alpha$  imbalance-Faktor,  $\tau$  gradient spacing,  $D$  Diffusionskoeffizient

Die scheinbaren Molekülmassen, bei bekannter Molekülmasse von DSS (196,34 g\* $\text{mol}^{-1}$ ) wurden bestimmt über:

$$M_{Prot} = M_{DSS} \cdot \left( \frac{C_{DSS}}{C_{Prot}} \right)^3$$

**Formel 17: Bestimmung der Molekülmasse des Proteins anhand des internen Standards DSS**

$M$  Molekülmasse,  $C$  Fit-Parameter

Die relativen hydrodynamischen Radii, bei bekannten hydrodynamischen Radius von DSS (0,346  $\pm$  0,004 nm) wurde bestimmt über (Wierschem, 2013):

$$\frac{C_{DSS}}{C_{Prot}} = \frac{R_{H Prot}}{R_{H DSS}}$$

**Formel 18: Beziehung Fitparameter C zu hydrodynamischen Radius  $R_H$**

$R_H$  hydrodynamischer Radius,  $C$  Fit-Parameter

Es wird der Signalabfall des Proteins bei 0,95 ppm sowie der Signalabfall der Referenzsubstanz DSS bei 0 ppm bestimmt. Hierbei wird für jede Gradientenstufe das betrachtete Signal auf das Ausgangssignal bei 5% Gradientenstärke manuell skaliert und der Skalierungsfaktor notiert. Die Kehrwerte der Skalierungsfaktoren des Proteins bei 0,95 ppm werden zusammen mit den Kehrwerten der Skalierungsfaktoren des DSS-Signals gegen die relative Gradientenstärke in *Origin 6.0* aufgetragen. Die Kurvenverläufe werden mit der Formel 15 gefittet, wobei *Origin 6.0* den Wert für den Fit Parameter  $C$  ausgibt (Johnson Jr., 1999; Munte et al., 2008).

### 3.5.6 Titrationsen von PC2 mit dem Formin mDia1

#### 3.5.6.1 Allgemeines

Um die Interaktion der verschiedenen PC2-Fragmente mit dem Formin mDia1 zu untersuchen, werden Titrationsexperimente durchgeführt. Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einem fünfmaligen molaren Überschuss gegenüber PC2 zugegeben. Alle für die Titrationsen verwendeten Proben werden im Vorfeld der Messungen mindestens zweimal für mehrere Stunden in exakt demselben Messpuffer dialysiert. Die DSS-,  $\text{NaN}_3$ -, AEBSF- und  $\text{D}_2\text{O}$ -Zugabe erfolgt direkt vor der Messung.

#### 3.5.6.2 Durchführung

Für die Titrationsen der Fragmente PC2(680-968) und PC2(717-792) mit mDia1(69-451) wird eine Start- und eine Endprobe erstellt (vgl. Tabelle 3, Tabelle 4). Die Startprobe enthält 60  $\mu\text{M}$  PC2, die Endprobe 60  $\mu\text{M}$  PC2 sowie 300  $\mu\text{M}$  mDia1(69-451). Dies entspricht einem fünfmaligen molaren Überschuss von mDia1 gegenüber PC2 in der Probe. Von der Startprobe und der Endprobe wurden  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren und 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren aufgenommen. Im Verlauf der Titration wird immer mehr von der Endprobe zur Startprobe hinzugegeben, entsprechend den gewünschten mDia1-Konzentrationen in der Probe. Für jeden Schritt werden wiederum  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren und 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren aufgenommen. Da beide Proben die exakt gleiche PC2-Konzentration enthalten und sich ebenso in exakt demselben Puffer befinden, ändert sich dadurch nur die mDia1-Konzentration in der neuen Probe, wobei alle anderen Faktoren gleichbleiben. Im Verlauf der Titration muss das Volumen der Probe zu gegebenen Schritten reduziert werden. Es wird darauf geachtet, dass das Volumen der Probe immer zwischen 500 und 600  $\mu\text{l}$  beträgt.

	c [ $\mu\text{M}$ ]	c [ $\mu\text{M}$ ]	
	PC2(680-796)	mDia1(69-451)	Verhältnis
Startprobe	60.0	0	1:0
Endprobe	60.0	300.0	1:5.0
Schritt 1	60.0	10.3	1:0.2
Schritt 2	60.0	21.8	1:0.4
Schritt 3	60.0	31.7	1:0.5
Schritt 4	60.0	48.7	1:0.8
Schritt 5	60.0	79.9	1:1.3
Schritt 6	60.0	120.0	1:2
Schritt 7	60.0	150.0	1:2.5

Tabelle 3: Proteinkonzentrationen und -verhältnisse bei der PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Titration

	c [ $\mu$ M]	c [ $\mu$ M]	
	PC2(717-792)	mDia1(69-451)	Verhältnis
Startprobe	60.0	0	1:0
Endprobe	60.0	300.0	1:5.0
Schritt 1	60.0	10.4	1:0.2
Schritt 2	60.0	20.2	1:0.3
Schritt 3	60.0	29.2	1:0.5
Schritt 4	60.0	50.0	1:0.8
Schritt 5	60.0	79.8	1:1.3
Schritt 6	60.0	118.8	1:2.0
Schritt 7	60.0	150.7	1:2.5

**Tabelle 4:** Proteinkonzentrationen und -verhältnisse bei der PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Titration

### 3.5.6.3 Aquisition und Prozessierung der Spektren

Die Titrationsen von PC2(717-792) und PC2(680-968) mit mDia1(69-451) wurden an einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer durchgeführt. Es wurden die teils modifizierten Pulsprogramme *hsqcetf3gpsi2* für die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren (Davis et al., 1992; Kay et al., 1992; Palmer et al., 1991; Schleucher et al., 1994) und *noesygppr1d* für die 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren (Vögeli, 2014) verwendet. Die Pulsprogramme für die Diffusionsmessungen sind in 3.5.5 aufgeführt. Die Spektren werden für die Auswertung der chemischen Verschiebungen mit einem GM-Filter (Lorentz-to-Gauss) mit einer Linienbreite von LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2) prozessiert. Die Prozessierung für die Auswertung der Signalvolumina erfolgte mit einem exponentiellen Filter (EM) und der Linienbreite LB (F2: 3, F1: 3). Die 1D-Spektren werden in *TopSpinPlot* als *postscript*-Datei gespeichert und im Grafikprogramm *Corel Draw X7* beschriftet und farblich aufbereitet. Die 2D-Spektren werden in *TopSpin* als *pdf*-Datei oder in *Auremol* mit dem Befehl *copy to clipboard* gespeichert und in das Grafikprogramm *Corel Draw X7* importiert, dort beschriftet und farblich aufbereitet.

### 3.5.6.4 Auswertung der Spektren

Die so prozessierten  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren werden im Programm *Bruker TopSpin* phasenkorrigiert und mittels der bei jedem Schritt mitaufgenommenen  $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren auf DSS geeicht (s. 3.5.9). Die Auswertung der  $^1\text{H}$ -NOESY- und  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren erfolgte in den Programmen *Bruker TopSpin* und *Auremol*. Die zugeordneten Signale werden von Titrationschritt zu Titrationschritt verfolgt. Die Auswertung der chemischen Verschiebungen wird an den GM-prozessierten Spektren, die Auswertung der Signalvolumina an den EM-prozessierten Spektren durchgeführt. Aus den Werten der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen wird die kombinierte chemische Verschiebung  $\Delta\delta_{\text{comb}}$  nach Schumann errechnet (Schumann, 2007). Für die Volumenänderungen wird  $(V - V_0)/V_0$  errechnet, wobei  $V$  das Volumen des Signals bei maximaler mDia1-Konzentration und  $V_0$  das Volumen des Signals ohne mDia1 in der Probe ist. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen sowie der Volumina der einzelnen Aminosäuren durch die mDia1-Zugabe werden auf Signifikanz überprüft. Mittels eines iterativen Verfahrens nach Schuman et al. wird das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  berechnet (Schumann, 2007). Dazu wird im ersten Schritt  $\sigma_0$  für alle chemischen Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta$  bzw. Volumenänderungen  $(V - V_0)/V_0$  errechnet. Hierbei werden alle Werte außerhalb von dreimal  $\sigma_0$  entfernt, wodurch man ein erstes korrigiertes Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  für die übrig gebliebenen  $\Delta\delta$  erhält. Gibt es dann immer noch Werte, die dreimal größer als das neue das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  sind, werden diese erneut

entfernt und ein weiteres korrigiertes Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  errechnet. Dies wird sooft wiederholt, bis keine Werte größer als dreimal das neueste korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  übrigbleiben. Das finale korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  stellt nun den Schwellenwert dar, unterhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$  liegende Werte werden als nicht signifikant eingestuft. Die signifikanten Änderungen der chemischen Verschiebungen sowie der Signalvolumina werden tabellarisch dargestellt und mit dem Programm *pyMOL* auf die 3-D-Strukturen der PC2-Fragmente übertragen.

### 3.5.6.5 Berechnung der Affinität von PC2 für mDia1(69-451)

Die  $K_D$ -Werte für die PC2-mDia1-Interaktion werden anhand von Formel 19 und Formel 20 und ermittelt.

$$\Delta I = \frac{\Delta I_{P-L}}{2c_p^{\text{total}}} \left( (c_p^{\text{total}} + c_L^{\text{total}} + K_D^1) - \sqrt{(c_p^{\text{total}} + c_L^{\text{total}} + K_D^1)^2 - 4 \cdot (c_p^{\text{total}} \cdot c_L^{\text{total}})} \right) + \Delta I_0$$

**Formel 19: Berechnung der Affinität für mDia1 anhand der Änderungen der Signalvolumina von PC2**

$c_p^{\text{total}}$  und  $c_L^{\text{total}}$  sind definiert als Gesamtkonzentrationen des Proteins bzw. des Liganden ( $\text{Ca}^{2+}$ ),  $\Delta I$  als  $I - I_0$ ,  $\Delta I_0$  als  $I_P - I_0^1$  und  $\Delta I_{P-L}$  als  $I_{P-L} - I_P$ .  $I_0$ ,  $I_P$  und  $I_{P-L}$  sind die Signalvolumina bei der niedrigsten Ligandenkonzentration, in Abwesenheit des Liganden und bei Sättigung mit dem Liganden.  $K_D^1$  ist der durch den Fit ermittelte  $K_D$ -Wert für die PC2-mDia1-Interaktion (Schumann et al., 2009a).

$$\Delta \delta^1 = \frac{\Delta \delta_{P-L}^1}{2c_p^{\text{total}}} \left( (c_p^{\text{total}} + c_L^{\text{total}} + K_D^1) - \sqrt{(c_p^{\text{total}} + c_L^{\text{total}} + K_D^1)^2 - 4 \cdot (c_p^{\text{total}} \cdot c_L^{\text{total}})} \right) + \Delta \delta_0^1$$

**Formel 20: Berechnung der Affinität für mDia1 anhand der chemischen Verschiebungsänderungen der Signale von PC2**

$c_p^{\text{total}}$  und  $c_L^{\text{total}}$  sind definiert als Gesamtkonzentrationen des Proteins bzw. des Liganden ( $\text{Ca}^{2+}$ ),  $\Delta \delta^1$  als  $\delta^1 - \delta_0^1$ ,  $\Delta \delta_0^1$  als  $\delta_P^1 - \delta_0^1$  und  $\Delta \delta_{P-L}^1$  als  $\delta_{P-L}^1 - \delta_P^1$ .  $\delta_0^1$ ,  $\delta_P^1$  und  $\delta_{P-L}^1$  sind die chemischen Verschiebungen bei der niedrigsten Ligandenkonzentration, in Abwesenheit des Liganden und bei Sättigung mit dem Liganden.  $\Delta \delta_0^1$  ist ein zusätzlicher Fitparameter, wenn bei Titrationsreihen Spektren bei Abwesenheit des Liganden nicht vorhanden sind.  $K_D^1$  ist der durch den Fit ermittelte  $K_D$ -Wert für die PC2-mDia1-Interaktion (Schumann et al., 2009a).

## 3.5.7 NMR-spektroskopische Untersuchungen an $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck

### 3.5.7.1 Durchführung

Um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung an  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck zu untersuchen werden bei verschiedenen Druckpunkten von 1 MPa bis 250 MPa 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren aufgenommen und zusätzlich bei ausgewählten Druckpunkten Diffusionsmessungen durchgeführt (verwendete Pulsprogramme s. 3.5.12). Die Probe befindet sich für die Messungen in einer speziellen druckstabilen Hochdruckzelle und verbleibt im gesamten Verlauf der Druckreihe im Spektrometer. Die Messungen wurden mit einem einlinigen Hochdrucksystem, das am Lehrstuhl entwickelt wurde, durchgeführt (Arnold et al., 2003). Der Druck wurde durch die selbstgebaute manuelle oder die vom Spektrometer aus gesteuerte Pumpe erzeugt.

### 3.5.7.2 Auswertung der Spektren

Nicht strukturell bedingte druckinduzierte chemische Verschiebungsänderungen, wie sie auch bei ungefalteten Peptiden auftreten, werden durch Korrektur der chemischen Verschiebungen auf Basis der Random-Coil-Koeffizienten für Peptide aus den Daten herausgerechnet (Arnold et al., 2002; Koehler et al., 2012). Aus den  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -chemischen Verschiebungen wird die kombinierte chemische Verschiebung  $\Delta\delta_{\text{comb}}$  nach Schumann errechnet (Schumann, 2007). Die korrigierten kombinierten chemischen Verschiebungen werden gegen den Druck aufgetragen, mit Formel 21 gefittet und die Druckkoeffizienten 1. und 2. Ordnung  $B_1^*$  und  $B_2^*$  berechnet. Die Größe der Druckkoeffizienten hängt von der Stärke der Konformationsänderungen im Protein ab und kann daher als semi-quantitatives Maß für diese Änderungen benutzt werden (Kalbitzer et al., 2013).

$$\delta^*(p, T_0) = \delta_0^*(p_0, T_0) + B_1^*(p - p_0) + B_2^*(p - p_0)^2$$

**Formel 21: Berechnung der Druckkoeffizienten 1. und 2. Ordnung mittels Taylorerweiterung (Kalbitzer et al., 2013)**

$\delta_0^*$  kombinierte chemische Verschiebung bei Normaldruck  $p_0$ ,  $B_1^*$  und  $B_2^*$  Druckkoeffizienten 1. und 2. Ordnung

Die Populationen verschiedener Konformere des Proteins im schnellen Austausch ( $|\Delta\omega_{ij}| = |\omega_j - \omega_i| \ll 1/\tau_{\text{ex}}$ , mit Austauschkorrelationszeit  $\tau_{\text{ex}}$ ) werden im thermischen Gleichgewicht mit  $M$  Zuständen ( $i=1, N$ ) von der Differenz der freien Enthalpien  $\Delta G_{1i}^0$  bestimmt. Die beobachtete chemische Verschiebung ist eine Kombination der chemischen Verschiebungen jedes Zustands. Für ein 3-Zustandsmodell gilt Formel 22 (Kachel et al., 2006; Kalbitzer et al., 2013). Es wurde hierbei versucht, die informationstragenden Kurven der chemischen Verschiebungen der  $^1\text{H}$ - und  $^{15}\text{N}$ -Dimension mit angepassten Startwerten gleichzeitig zur Konvergenz zu bringen, wobei bei jedem Schritt der Berechnung je eine der informationstragenden Kurven nicht in die Berechnung miteinfließt. Die Auswertung erfolgte mit dem Program *R*.

$$\delta = \frac{\delta_1 + \sum_{i=2}^3 \delta_i \exp\left(-\frac{\Delta G_{1i}^0 + \Delta V_{1i}^0(p - p_0)}{RT}\right)}{1 + \sum_{i=2}^3 \exp\left(-\frac{\Delta G_{1i}^0 + \Delta V_{1i}^0(p - p_0)}{RT}\right)}$$

**Formel 22: Berechnung der Differenz der freien Enthalpien  $\Delta G_{1i}^0$  und der Volumina  $\Delta V_{1i}^0$  für die drei Zustände von PC2(717-792)**

$\Delta G_{1i}^0$  und  $\Delta V_{1i}^0$  sind die Differenzen der partiellen molaren Volumina bzw. der freien Enthalpien zwischen den Zuständen 1 und  $i$  bei Druck  $p_0$  und Temperatur  $T_0$ .  $\delta_i$  = chemische Verschiebungen für die drei Zustände von PC2(717-792),  $R$  = Gaskonstante

Die relativen Populationen  $p_i$  in einem  $N$ -Zustandssystem können aus den Gleichgewichtskonstanten  $K_{ij} = [j]/[i]$  errechnet werden, wobei 1 ein willkürlich gewählter Zustand ist (Kalbitzer et al., 2013):

$$p_i(p, T_0) = \frac{K_{1i}(p, T_0)}{\sum_{j=1}^N K_{1i}(p, T_0)}$$

**Formel 23: Relative Populationen in einem  $N$ -Zustandssystem**

Die Gleichgewichtskonstante  $K_{ji}$  ist gegeben durch (Kalbitzer et al., 2013):

$$K_{ji} = e^{-\frac{\Delta G_{ji}}{RT}}$$

**Formel 24: Gleichgewichtskonstante  $K_{ji}$**

Die aus Formel 22 errechneten Werte für  $\Delta G_{1i}^0$  und  $\Delta V_{1i}^0$  werden in Formel 25 eingesetzt und damit die aus den Diffusionsmessungen erhaltenen relativen Diffusionskonstanten (Kehrwerte der relativen hydrodynamischen Radii  $R_H$ ) gefittet. Dadurch wird für jeden der drei Zustände die Diffusionskonstante bei Normaldruck (1MPa) erhalten. Für die Auswertung der relativen hydrodynamischen Radii wird angenommen, dass der hydrodynamische Radius der Referenzsubstanz DSS unter Druckanwendung in etwa konstant bleibt. Zur Berechnung des relativen hydrodynamischen Radius von PC2(717-792) wurde der von Wierschem für DSS experimentell ermittelte hydrodynamische Radius von  $0,346 \pm 0,004$  nm verwendet (Wierschem, 2013).

$$D = \frac{D_1 + \sum_{i=2}^3 D_i \exp\left(-\frac{\Delta G_{1i}^0 + \Delta V_{1i}^0(p - p_0)}{RT}\right)}{1 + \sum_{i=2}^3 \exp\left(-\frac{\Delta G_{1i}^0 + \Delta V_{1i}^0(p - p_0)}{RT}\right)}$$

**Formel 25: Berechnung der Diffusionskonstanten der drei Zustände von PC2(717-792)**

$\Delta G_{1i}^0$  und  $\Delta V_{1i}^0$  sind die Differenzen der partiellen molaren Volumina bzw. der freien Enthalpien zwischen den Zuständen 1 und i bei Druck  $p_0$  und Temperatur  $T_0$ .  $D_i$  = Diffusionskonstanten für die drei Zustände von PC2(717-792),  $R$  = Gaskonstante

Für die Auswertung der Signalvolumina sind die Kompressionseffekte zu beachten. Da aufgrund des steigenden Drucks und der daraus resultierenden Kompression der Flüssigkeit die Konzentration von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) in der Druckzelle ansteigt, musste für die korrekte Auswertung der Signalvolumina im Verlauf der Druckreihe dieser Effekt herausgerechnet werden. Die Anwendung hoher Drücke auf Proteine führt zu lokalen und globalen Konformationsänderungen, die sich in den veränderten chemischen Verschiebungen und Signalvolumina widerspiegeln. Das im Puffer enthaltene Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) besitzt aufgrund seiner geringen Größe keine dreidimensionale Struktur und vollzieht somit keine Konformationsänderungen aufgrund des angewandten Drucks. Alle Änderungen des Signalvolumens des Trissignals sind daher auf die Konzentrationsänderung in der Probe durch den Kompressionseffekt zurückzuführen. Um den Effekt der Kompression auf die Proteinsignale herauszurechnen, werden die Signalvolumina von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) um den Faktor der Volumenzunahme des Trissignals korrigiert (vgl. Kalbitzer et al., 2013). Für die korrigierten Volumenänderungen wird  $(V - V_0)/V_0$  errechnet, wobei  $V$  das Signalvolumen des Signals beim betrachteten Druckschritt und  $V_0$  das Ausgangsvolumen des Signals bei 1 MPa darstellt. Die Änderungen der Druckkoeffizienten  $B_1^*$  und  $B_2^*$  sowie der Volumina im Verlauf der Druckreihe werden daraufhin auf Signifikanz überprüft. Mittels eines iterativen Verfahrens nach Schuman et al. wird das korrigierte Signifikanzniveaus  $\sigma_0^{\text{kor}}$  berechnet (Schumann, 2007). Dazu wird im ersten Schritt  $\sigma_0$  für alle Änderungen der Druckkoeffizienten  $B_1^*$  und  $B_2^*$  bzw. Volumenänderungen errechnet. Hierbei werden alle Werte außerhalb von dreimal  $\sigma_0$  entfernt, wodurch man ein erstes korrigiertes Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  für die übrig gebliebenen Werte erhält. Gibt es dann immer noch Werte, die dreimal größer als das neue das korrigierte Signifikanzniveaus  $\sigma_0^{\text{kor}}$  sind, werden diese erneut entfernt und ein weiteres korrigiertes Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  errechnet. Dies wird sooft wiederholt, bis keine Werte größer als dreimal das neueste korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  übrigbleiben. Das finale korrigierte Signifikanzniveaus  $\sigma_0^{\text{kor}}$  stellt nun den Schwellenwert dar, unterhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$  liegende Werte werden als nicht signifikant eingestuft. Die

signifikanten Änderungen der Druckkoeffizienten  $B_1^*$  und  $B_2^*$  sowie der Signalvolumina werden mit dem Programm *pyMOL* auf den 3-D-Strukturen der PC2-Fragmente dargestellt.

### 3.5.8 Überprüfung der Aromatenzuordnung von PC2(680-796)

Zur Überprüfung der Aromatenzuordnung von PC2(680-796) werden ein  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum sowie ein  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum aufgenommen. Für die Referenzierung auf DSS wird jeweils ein dazugehöriges 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum aufgenommen. Es werden die Pulsprogramme *mlevggphw5* für das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum, *noesyggphw5* für das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum und *noesygppr1d* für die 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren verwendet (A. Bax, D.G. Davis, 1985; Liu et al., 1998; Vögeli, 2014). Die Daten werden mit einem GM-Filter (Lorentz-to-Gauss) mit LB (F2: -6, F1: -8) und GB (F2: 0,12, F1: 0,1) prozessiert und in das Programm *Auremol* importiert. Zur Beschriftung und farblichen Darstellung werden die Spektren in das Grafikprogramm *Corel Draw X7* importiert.

### 3.5.9 Eichung der $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren

Um die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren auf DSS zu referenzieren, wird direkt vor bzw. nach jedem  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum ein 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum aufgenommen. Nach der Eichung des 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrums auf das Referenzsignal DSS bei 0 ppm wird aus der Spektrometerfrequenz für  $^1\text{H}$ -Dimension die Spektrometerfrequenz für  $^{15}\text{N}$ -Dimension nach Wishart et al. errechnet (Wishart et al., 1995).

### 3.5.10 Konzentrationsbestimmung mit NMR

Für die Konzentrationsbestimmungen der Proteine in Lösung werden 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren mit einem relaxations delay (D1) von 13 s aufgenommen und dafür das Pulsprogramm *noesygppr1d* verwendet (Vögeli, 2014). Durch Referenzierung auf das Integral einer Referenzsubstanz mit bekannter Konzentration kann anhand eines zugeordneten Proteinsignals die Konzentration des Proteins in der Probe bestimmt werden.

### 3.5.11 Berechnung der theoretischen molaren Massen der Proteine

Die Berechnung der theoretischen molaren Massen der Proteine erfolgt anhand der Aminosäuresequenz mit dem Online-Tool pI/Mw tool des Anbieters <http://web.expasy.org/> (2.14).

### 3.5.12 Pulsprogramme Zusammenfassung

Für die 1D- $^1\text{H}$ -Spektren wird das modifizierte Pulsprogramm *noesygppr1d* verwendet (Vögeli, 2014). Für die Diffusionsmessungen wird das modifizierte Pulsprogramm *diffu-oneshot* benutzt (Pelta et al., 2002). Für die Zuordnung der Aromaten werden die abgewandelten Pulsprogramme *mlevggphw5\_dec* für das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum und *noesyggphw5\_dec* für das  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum verwendet (A. Bax, D.G. Davis, 1985; Liu et al., 1998). Die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren werden mit den modifizierten Pulsprogrammen *hsqcetf3gpsi2*, *hsqcetf3g* (Davis et al., 1992; Kay et al., 1992; Palmer et al., 1991; Schleucher et al., 1994) aufgenommen (Tabelle 5).



Pulsprogramme 1-D	Pulsprogramme 2-D
<i>noesygp<sub>pr</sub>1d</i>	<i>hsqcetf3g<sub>psi</sub>2</i>
<i>noesygp<sub>pr</sub>1D</i>	<i>hsqcetf3g<sub>p</sub></i>
<i>diffu-oneshot</i>	<i>mlevggphw5_dec</i>
	<i>noesyggphw5_dec</i>

**Tabelle 5: Verwendete Pulsprogramme**

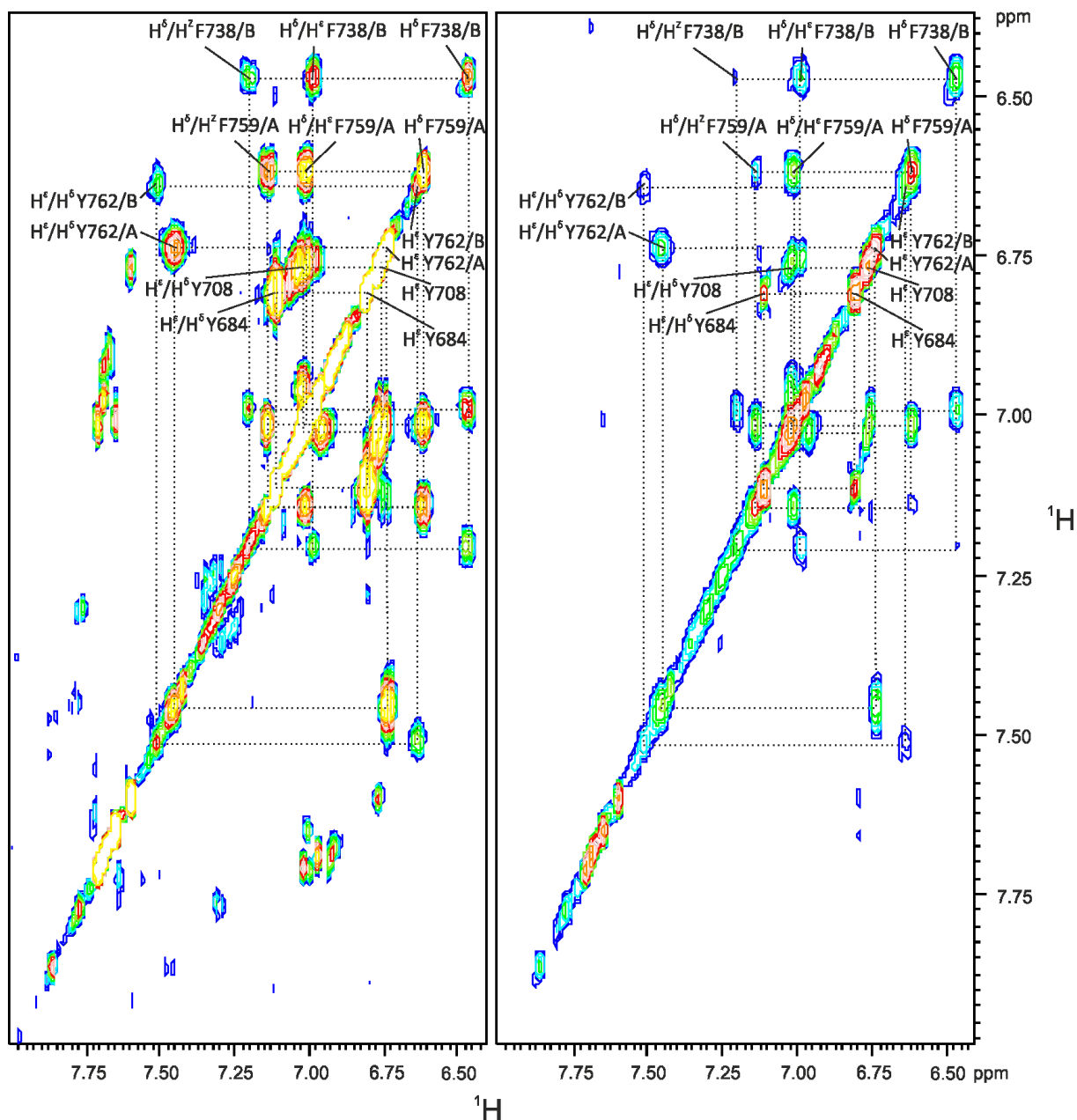
## 4 Ergebnisse

### 4.1 PC2(680-796)

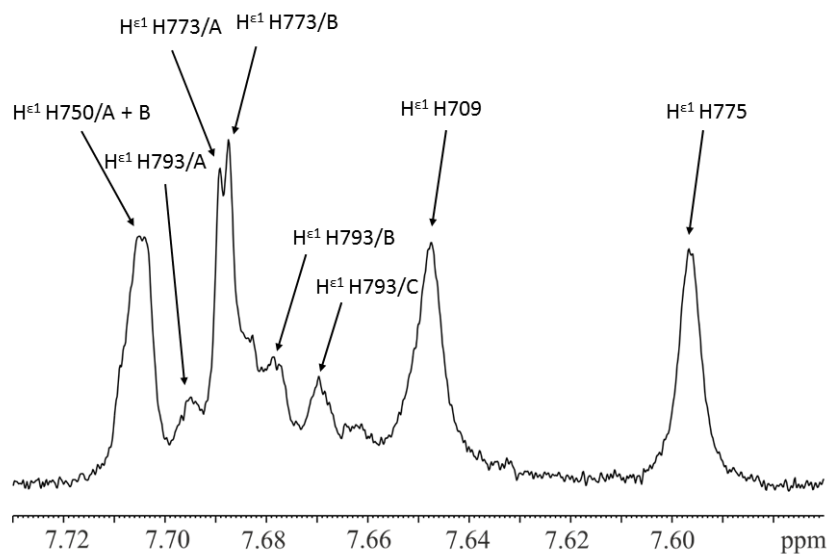
#### 4.1.1 Der Aromatenbereich von PC2(680-796): Identifizierung verschiedener Zustände

Für PC2(680-796) in D<sub>2</sub>O wurde bei höheren CaCl<sub>2</sub>-Konzentrationen die Aufspaltung eines Signals bei ca. 7,5 ppm im 1D-<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-NOESY-Spektrum beobachtet (Abbildung 19). Das Signal wurde bereits von Eberhardt als H<sup>δ</sup> von Y762 zugeordnet (Eberhardt, 2011). Bereits Eberhardt zeigte zwei Zustände dieses Signals im <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-TOCSY, konnte diese jedoch aufgrund der Überlagerung im 1D-NOESY nicht getrennt beobachten. Aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten modifizierten Bedingungen ohne hohe Konzentrationen NaCl im Messpuffer konnten die beiden Zustände von Y762 H<sup>δ</sup> im 1D-NOESY einzeln zugeordnet und ihre relativen Anteile bestimmt werden. Mittels <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-TOCSY- und <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-NOESY-Spektren konnte bestätigt werden, dass es sich bei den Signalen um zwei Zustände des H<sup>δ</sup> von Y762 handelt, da im <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-TOCSY Crosspeaks zu den bereits von Eberhardt als Y762/A H<sup>ε</sup> und Y762/B H<sup>ε</sup> zugeordneten Signalen vorhanden sind (Abbildung 20). Somit konnten unter den neuen Bedingungen die Signale bei 7,45 ppm und 7,51 ppm eindeutig als Y762/A H<sup>δ</sup> und Y762/B H<sup>δ</sup> identifiziert werden. Des Weiteren wurde die Zuordnung der Signale von F738 H<sup>δ</sup>, H<sup>ε</sup> und H<sup>ζ</sup> (6,49, 6,99, 7,20 ppm) und F759/A H<sup>δ</sup>, H<sup>ε</sup> und H<sup>ζ</sup> (6,61, 7,01 und 7,14 ppm) unter den neuen Bedingungen ohne Hochsalz bestätigt. Die durch Referenzierung auf das Integral von Y684 H<sup>ε</sup> bestimmten Populationen zeigen für die Summe der Signale Y762/A H<sup>δ</sup> (0,73) und B (0,27) genau 1,00 und damit 100 % an, wobei Zustand A stärker vertreten ist (Tabelle 6). Das Signal F738 H<sup>δ</sup> weist nur eine Populationsstärke von 0,39 auf, was darauf hindeutet, dass es sich hier um den Zustand B von F738 H<sup>δ</sup> handelt. Die fehlenden 61 % eines zweiten Zustands A für F738 H<sup>δ</sup> sind jedoch im Spektrum nicht sichtbar. Für die beiden sich überlagernden Signale F759 H<sup>δ</sup> und Y762/B H<sup>ε</sup> ergibt sich ein Gesamtintegral, das einer Population von 1,01 entspräche. Zieht man von diesem Wert die durch H<sup>δ</sup> Y762/B berechnete Population von 0,27 für den Zustand B von Y762 ab, erhält man eine Population von 0,74 für F759 H<sup>δ</sup>. Dies entspräche aufgrund des Anteils einem Zustand A für F759 H<sup>δ</sup>, ein zweiter Zustand B von F759 H<sup>δ</sup> ist im Spektrum nicht zu identifizieren. Auffällig ist die starke Hochfeldverschiebung von F738/B H<sup>δ</sup> (6,49 ppm) und H<sup>ε</sup> (6,99 ppm) sowie F759/A H<sup>δ</sup> (6,61 ppm) und H<sup>ε</sup> (7,01 ppm) im Vergleich zu den typischen Random-Coil-Werten von Phenylalaninen bei 7,29 ppm für H<sup>δ</sup> und 7,39 ppm für H<sup>ε</sup> (Arnold et al., 2002). Durch die Kennzeichnung der beiden Phenylalanine F738 (atypische EF-Hand) und F759 (nahe kanonischer EF-Hand) in der von Allen et al. veröffentlichten 3D-Struktur des C-Terminus von PC2 konnte in Abbildung 23 die räumliche Orientierung der Aromaten der beiden Aminosäuren ermittelt werden (PDB: 2Y4Q) (Allen et al., 2014). Dabei wird deutlich, dass die Aromaten der Phenylalanine direkt übereinander liegen. Die auftretende Ringstromverschiebung verursacht mit großer Wahrscheinlichkeit die starke Verschiebung aller Phenylalaninsignale in Richtung Hochfeld. Y762/A H<sup>δ</sup> (0,73, 7,45 ppm) und Y762/B H<sup>δ</sup> (0,27, 7,51 ppm) sind stark tieffeldverschoben im Vergleich zu den Random-Coil-Werten für H<sup>δ</sup>-Signale bei Tyrosinen (7,15 ppm). Im Gegensatz dazu sind Y762/A H<sup>ε</sup> (6,74 ppm) und Y762/B H<sup>ε</sup> (6,64 ppm) sogar leicht hochfeldverschoben (Random-Coil-Wert bei 6,85 ppm für H<sup>ε</sup> von Tyrosin), wobei Zustand A fast im Random-Coil-Bereich liegt. Die ppm-Werte für Y684 H<sup>ε</sup> und Y684 H<sup>δ</sup> sind mit 6,806 und 7,112 sehr nahe an den Random-Coil-Werten. Für Y708 sind sowohl das H<sup>δ</sup> als auch das H<sup>ε</sup> hochfeldverschoben (vgl. Arnold et al. 2002). Die Zuordnung der H<sup>ε1</sup>-Signale der fünf Histidine erfolgte anhand der Zuordnung von Eberhardt in der Reihenfolge ihres Auftretens von Tief- nach Hochfeld (Eberhardt, 2011). Über die Populationen der fünf Histidine von PC2(680-796) lassen sich folgende Aussagen treffen: H750 H<sup>ε1</sup> (1,07), H775 H<sup>ε1</sup> (1,01) und H709 H<sup>ε1</sup> (1,07) weisen ein Integral

Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 134  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, pH 9.2, 1.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, in D<sub>2</sub>O. Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit LB = 2.00.

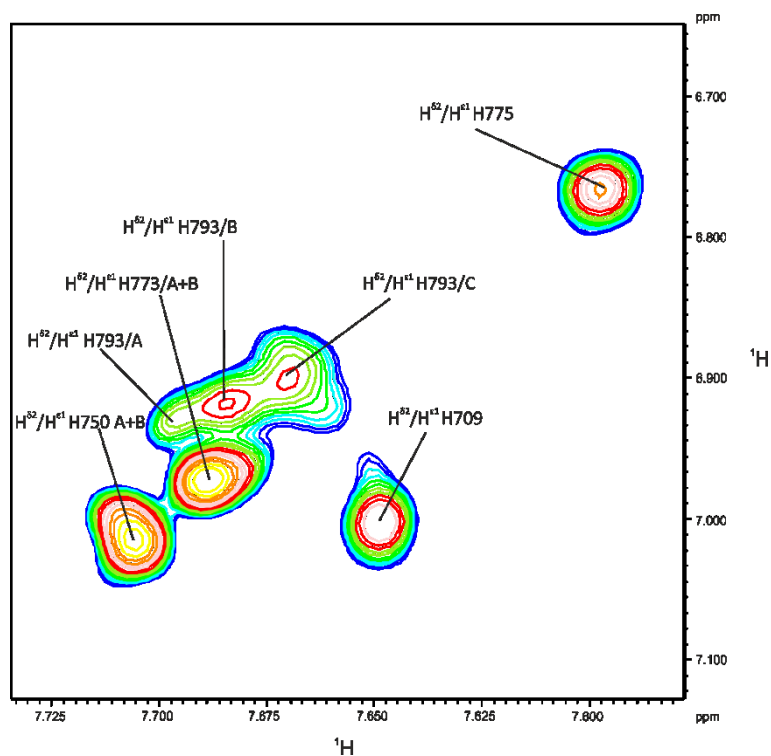


**Abbildung 20:**  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY-Spektrum (links) und  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum (rechts) von PC2(680-796) bei 1.9 mM  $\text{CaCl}_2$ . Messbedingungen:  $V = 660 \mu\text{l}$ ,  $134 \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ , 1.9 mM  $\text{CaCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 200  $\mu\text{M}$  DSS, pH 9.2, in  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 4096, F1: 1024); NS 24. Datenprozessierung: SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter mit LB (F2: -6, F1: -8) und GB (F2: 0,12, F1: 0,1).



**Abbildung 21: Vergrößerter Ausschnitt der  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der fünf Histidine**

Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 134  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, pH 9.2, 1.9 mM  $CaCl_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, in  $D_2O$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit LB = 0.1.

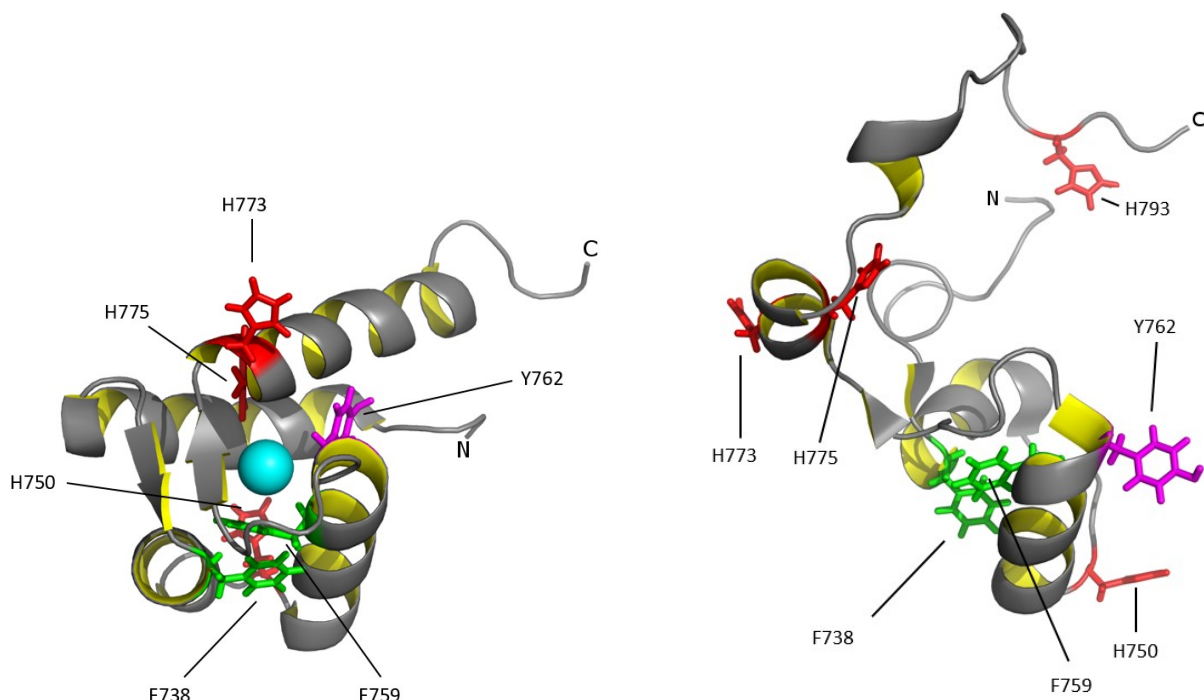


**Abbildung 22: Vergrößerter Ausschnitt der Crosspeaks der  $H^{\epsilon 2}$ - und  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der fünf Histidine im  $^1H$ -  $^1H$ -TOCSY-Spektrum**

Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 134  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, 1.9 mM  $CaCl_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, pH 9.2, in  $D_2O$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 4096, F1: 1024); NS 24. Datenprozessierung: SI (F2: 4096, F1: 4096); GM-Filter mit LB (F2: -6, F1: -8) und GB (F2: 0,12, F1: 0,1).

Peak	Chemische Verschiebung $\delta$ [ppm]	Population
H $^{\epsilon}$ Y684 (Referenz)	6,806	1,00
H $^{\epsilon 1}$ H750/A + B	7,705	1,07
H $^{\epsilon 1}$ 773/A + B	7,688	0,97
H $^{\epsilon 1}$ 793/A	7,696	0,25
H $^{\epsilon 1}$ 793/B	7,679	0,40
H $^{\epsilon 1}$ 793/C	7,670	0,37
H $^{\epsilon 1}$ H709	7,648	1,07
H $^{\epsilon 1}$ H775	7,597	1,01
H $^{\delta}$ Y762/B	7,507	0,27
H $^{\delta}$ Y762/A	7,453	0,73
H $^{\delta}$ F738	6,468	0,39
H $^{\delta}$ F759 + H $^{\epsilon}$ Y762/B	6,614	1,01

Tabelle 6: Populationen und chemische Verschiebungen  $\delta$  der Signale von PC2(680-796) im 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum



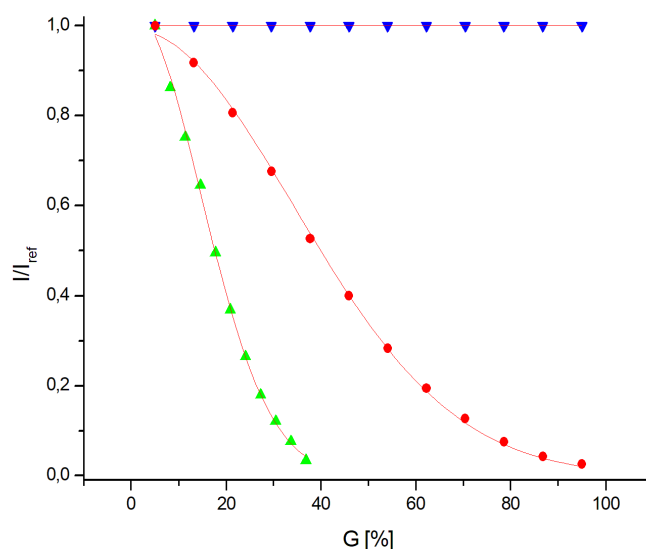
**Abbildung 23: 3D-Strukturen des C-Terminus von PC2: Links Fragment AS 717-792 (PDB: 2Y4Q) und rechts Fragment AS 680-796 (PDB: 2KLE)**

Links: Gezeigt werden die in der Struktur benachbarten Phenylalanine F738 und F759 (beide grün), Tyrosin Y762 (magenta), die Histidine H773, H775 und H750 (alle rot) sowie das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion in der kanonischen EF-Hand (cyan). Für F738 (atypische EF-Hand) und F759 (nahe kanonischer EF-Hand) liegen die Aromaten direkt übereinander, H $^{\delta}$  F738 und H $^{\delta}$  F759 sind im 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum tieffeldverschoben in Bezug auf den Random-Coil-Wert (Arnold et al., 2002). Das Y762 H $^{\delta}$  ist wahrscheinlich aufgrund der Interaktion mit dem Aromaten von H775 tieffeldverschoben, das Y762 H $^{\epsilon}$  leicht hochfeldverschoben.

Rechts: Das Fragment 680-796 (rechts) enthält zwei zusätzliche Histidine, von denen jedoch nur H793 (rot) in der Struktur enthalten ist. Für F738 (atypische EF-Hand) und F759 (nahe kanonischer EF-Hand) liegen die Aromaten nicht mehr direkt übereinander. Auch H $^{\delta}$  Y 762 scheint nicht mehr mit dem Aromaten von H775 zu interagieren.

#### 4.1.2 Diffusionsmessungen an PC2(680-796)

Die  $1D\text{-}^1\text{H}$ -Diffusionsmessungen zeigen in Anwesenheit von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  eine scheinbare Molekülmasse von  $32048 \pm 2527$  g/mol und einen relativen hydrodynamischen Radius von  $1,891 \pm 0,072$  an (Tabelle 7). Die berechnete Molekülmasse für ein Dimer PC2(680-796) inklusive zwei Kalziumionen beträgt 27,875 g/mol. Es wurde der Signalabfall der Proteinsignale von 0,83 ppm bis 1,09 ppm mit dem Signalabfall von DSS (Signal bei 0 ppm) als Referenz verglichen. Die Stabilität des Gradienten wurde mittels PAA bestätigt. Die Signalabfälle wurden gegen den Gradienten aufgetragen (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Aggregationszustand von PC2(680-796)**

Graph von  $I/I_{\text{ref}}$  als Funktion der relativen Gradientenstärke  $G$ , wobei  $I$  die Signalintensität beim Gradienten  $G$  und  $I_{\text{ref}}$  die Signalintensität beim niedrigsten Gradienten angibt. Als Referenz wurde DSS benutzt. Polyacrylamid (90% $\text{H}_2\text{O}$ , 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) wurde im Vorfeld der Messungen benutzt, um die Stabilität des Gradientensystems zu überprüfen. Gezeigt wird der Signalabfall von PAA (blau),  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) (rot) und DSS (grün). Messbedingungen:  $V=500\text{ }\mu\text{l}$ ,  $60\text{ }\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 25  $\mu\text{M}$  AEBSF, 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 8192, F1: 12); NS 90. Datenprozessierung: SI (F2: 8192, F1: 12); GM-Filter mit  $\text{LB} = -8$  und  $\text{GB} = 0.1$ .

$R_h^a$	$M_{\text{exp}}^b$	$M_{\text{calc}}^c$
	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
$1,891 \pm 0,072$	$32048 \pm 2527$	27,875

**Tabelle 7: Scheinbare Molekülmassen und relativer hydrodynamischer Radius von PC2(680-796) in Anwesenheit von 10 mM  $\text{CaCl}_2$ .**

Messbedingungen:  $V=500\text{ }\mu\text{l}$ ,  $60\text{ }\mu\text{M}$   $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 25  $\mu\text{M}$  AEBSF, 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 8192, F1: 12); NS 90. Datenprozessierung: SI (F2: 8192, F1: 12); GM-Filter mit  $\text{LB} = -8$  und  $\text{GB} = 0.1$

<sup>a</sup> Berechneter relativer hydrodynamischer Radius von PC2(680-796). Es wurde der von Wierschem für DSS experimentell ermittelte hydrodynamische Radius von  $0,346 \pm 0,004$  nm zur Berechnung des relativen hydrodynamischen Radius von PC2(680-796) verwendet (Wierschem, 2013)

<sup>b</sup> experimentell ermittelte scheinbare Molekülmasse von PC2(680-796) in der Probe mit DSS ( $196,34\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) als Referenz

<sup>c</sup> auf Basis der Sequenz berechnete Molekülmasse eines Dimers von PC2(680-796) einschließlich zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

#### 4.1.3 Interaktion von PC2(680-796) mit Ca<sup>2+</sup>-Ionen in D<sub>2</sub>O

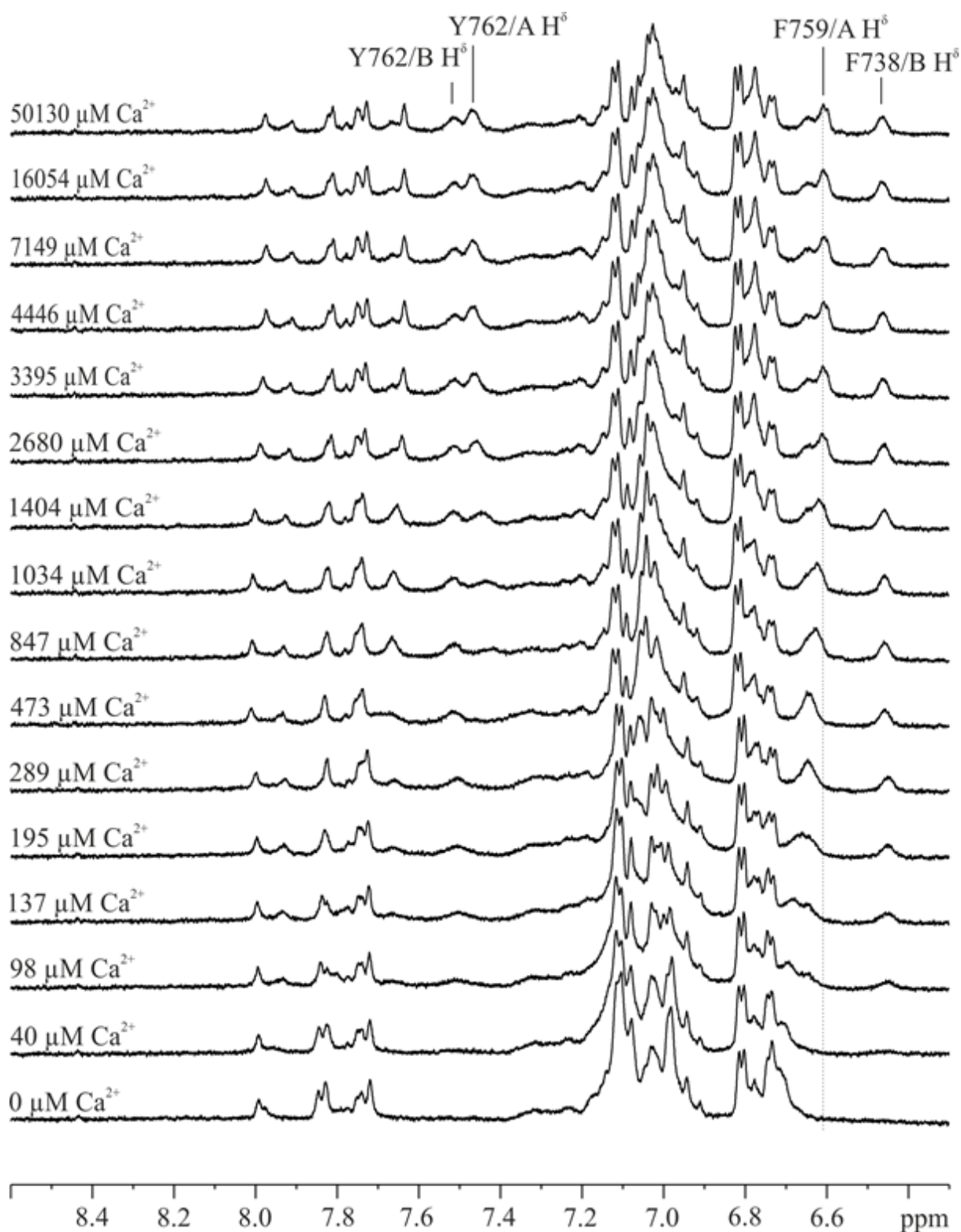
Schumann et al. und Eberhardt konnten ebenso wie Allen et. al und Petri et al. eine Interaktion des zytosolischen C-Terminus von PC2 mit Kalziumionen nachweisen (Allen et al., 2014; Ćelić et al., 2012; Eberhardt, 2011; Petri et al., 2010a; Schumann et al., 2009a). Um die Signale der Tyrosine, Phenylalanine und Histidine frei von Überlagerungen verfolgen zu können, wurde mit den Proben ein D<sub>2</sub>O-Austausch nach Lyophyllisieren durchgeführt. Für die Titration wurde PC2(680-796) bei pH 7,5 in Schritten CaCl<sub>2</sub> bis zu einem Maximalwert von ca. 50 mM zugesetzt. Der pH wurde vor der Messung mittels pH-Elektrode auf 7,5 eingestellt. Wie das Tris-Signal zeigt, bleibt der pH während der Titration mit Kalziumionen konstant, da praktisch keine chemische Verschiebung des Signals stattfindet. Alle beobachteten chemischen Verschiebungen können demnach ausschließlich auf die Kalziumzugabe zurückgeführt werden (vgl. Tabelle 8).

	Chemische Verschiebung $\delta$ [ppm]
CaCl <sub>2</sub> [ $\mu$ M]	Tris
0	3,699
40	3,699
98	3,699
137	3,699
195	3,699
289	3,698
473	3,698
847	3,698
1034	3,698
1404	3,698
2680	3,698
3395	3,698
4446	3,698
7149	3,698
16054	3,698
50130	3,698

**Tabelle 8:** Bestätigung der pH-Stabilität anhand der chemischen Verschiebung  $\delta$  [ppm] des Trissignals im Verlauf der Titration mit CaCl<sub>2</sub>

Die Probe wurde ohne Kalziumionen aufgereinigt. Um natürlicherweise vorkommende Kalziumionen aus der Probe zu entfernen, wurde in kleinen Schritten EDTA zugegeben, bis das bereits von Schumann et al. als Marker für die Kalziumbindung identifizierte Signal F738H<sup>6</sup> nicht mehr sichtbar war. Hierfür wurden 79  $\mu$ M EDTA benötigt, wodurch von einem vorherigen Restkalzium von ebenso 79  $\mu$ M in der Probe ausgegangen werden kann. Nach EDTA-Zugabe wird davon ausgegangen, dass sich keine freien Ca<sup>2+</sup>-Ionen mehr in der Probe befinden. Dieser Schritt wird als Startpunkt der Titration gewählt und entspricht 0  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>. Abbildung 25 zeigt den Aromatenbereich von PC2(680-796) im Verlauf der Titration mit CaCl<sub>2</sub>.





**Abbildung 25: 1D-<sup>1</sup>H -NOESY-Spektren von PC2(680-796) bei pH 7.5 im Verlauf der Titration mit CaCl<sub>2</sub>**

Beim Startschritt definiert als 0  $\mu\text{M Ca}^{2+}$  sind 79  $\mu\text{M}$  EDTA in der Probe enthalten. EDTA wurde dabei in Schritten zugegeben bis das Integral von F738 H<sup>6</sup> dem Wert 0 entsprach. Ein Integral von 0 für das Signal F738 H<sup>6</sup> wurde definiert als der Punkt, an dem sich kein freies Ca<sup>2+</sup> mehr in der Probe befindet. Messbedingungen: V = 500  $\mu\text{l}$ , 74  $\mu\text{M}$  PC2(680-796), T = 298K, pH 7.5, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 50  $\mu\text{M}$  DSS, 99,9 % D<sub>2</sub>O. Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit LB = 0.3.

Tabelle 9 zeigt die Populationen der zugeordneten Tyrosin- und Phenylalaninsignale nach Referenzierung auf das Integral von Y684 H<sup>ε</sup>. Die Populationen für die zwei Zustände für Y762 H<sup>δ</sup>, deren Signale ohne Kalzium in der Probe nicht sichtbar sind, nehmen im Verlauf der Titration stetig zu, bis bei Sättigung ein Verhältnis von 60 (Y762/A H<sup>δ</sup>) zu 40 (Y762/B H<sup>δ</sup>) erreicht wird, die in der Summe die Gesamtpopulation von Y762 H<sup>δ</sup>, sprich zwei Protonen, darstellen. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass Y762/B H<sup>δ</sup> schon bei niedrigeren Kalziumkonzentrationen besetzt ist, während Zustand A viel später auf die Kalziumzugabe reagiert.

Von F738 H<sup>δ</sup> ist nur Zustand B des Signals zu sehen, der sich nahezu identisch zu Y762/B H<sup>δ</sup> verhält und nur zu 40 % populierte ist. Von F759 H<sup>δ</sup> hingegen scheint nur der zu 60 % populierte Zustand A sichtbar zu sein, dessen Zunahme aufgrund der Überlagerungen von Signalen jedoch nicht verifiziert werden kann. Wahrscheinlicher scheint aufgrund des Gesamtintegrals mit der Überlagerung durch H<sup>ε</sup> Y762/B, dass bereits ohne Kalzium 60 % von F759 H<sup>δ</sup> und damit der Sättigungswert von F759/A H<sup>δ</sup> vorhanden ist (vgl. Tabelle 9). Auffällig ist, dass die Y762 H<sup>ε</sup>-Signale auch ohne Kalzium bereits ihre maximale Population aufweisen, nämlich 60 % für Y762/A H<sup>ε</sup> und wahrscheinlich 40 % für Y762/B H<sup>ε</sup>. Ab 2680 μM Kalzium kann das 60 zu 40-Verhältnis der Y762 H<sup>ε</sup>-Zustände aufgelöst werden. Tabelle 10 zeigt die chemischen Verschiebungen der Signale.

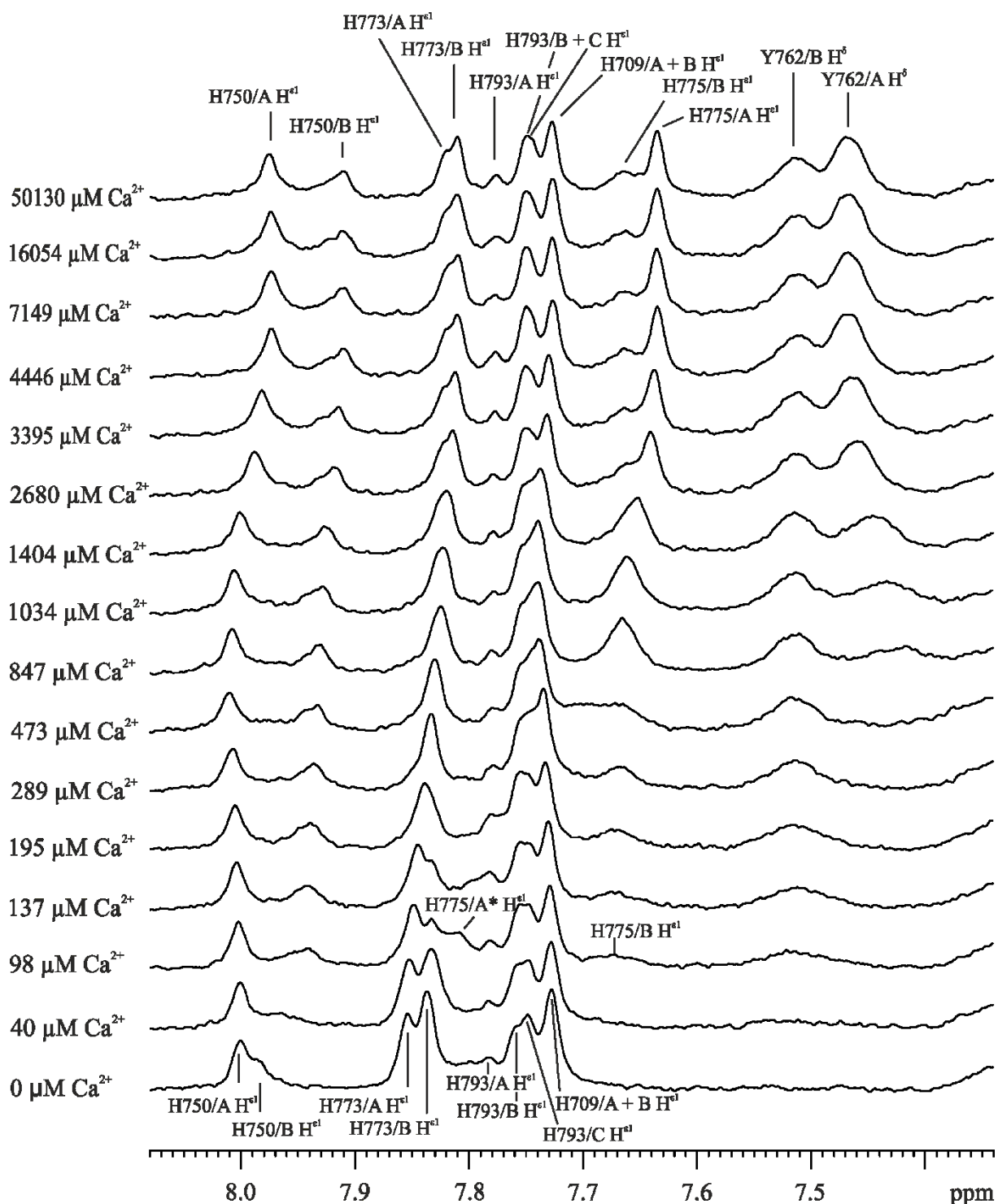
	Population					
CaCl <sub>2</sub> [μM]	F738/B H <sup>δ</sup>	Y762/A H <sup>δ</sup>	Y762/B H <sup>δ</sup>	Y762/A H <sup>ε</sup>	Y762/B H <sup>ε</sup>	F759/A H <sup>δ</sup>
0	0,00	0,00	0,00	(0,65)	(1,09)	
40	0,19	0,02	0,19	(0,65)	(1,01)	
98	0,26	0,04	0,26	0,65	1,14	
137	0,34	0,05	0,35	0,63	1,16	
195	0,37	0,07	0,39	0,59	1,15	
289	0,41	0,11	0,40	0,49	1,03	
473	0,40	0,18	0,39	0,52	1,03	
847	0,41	0,32	0,40	0,59	1,11	
1034	0,40	0,40	0,41	0,61	1,09	
1404	0,40	0,43	0,39	0,61	1,14	
2680	0,39	0,46	0,38	0,62	0,39	0,62
3395	0,40	0,50	0,39	0,62	0,47	0,65
4446	0,40	0,54	0,37	0,62	0,41	0,61
7149	0,41	0,58	0,38	0,60	0,48	0,68
16054	0,40	0,59	0,38	0,61	0,43	0,63
50130	0,39	0,60	0,41	0,61	0,42	0,61

**Tabelle 9: Populationen der Signale H<sup>δ</sup> Y762/A und B, H<sup>ε</sup> Y762/A und B sowie H<sup>δ</sup> F738/B und H<sup>δ</sup> F759/A im Verlauf der Titration mit CaCl<sub>2</sub> bei Referenzierung auf das Integral von Y684 H<sup>ε</sup>. In Klammern werden die Werte für nicht eindeutig auswertbare Titrationsschritte angezeigt**

	Chemische Verschiebung δ [ppm]					
CaCl <sub>2</sub> [μM]	F738/A H <sup>δ</sup>	Y762/A H <sup>δ</sup>	Y762/B H <sup>δ</sup>	Y762/A H <sup>ε</sup>	Y762/B H <sup>ε</sup>	F759/A H <sup>δ</sup>
0	-	-	-	(6,750)	6,723	6,716
40	6,457	-	7,515	6,749	6,715	6,707
98	6,457	-	7,515	6,747	6,703	6,695
137	6,460	-	7,515	6,746	6,691	6,685
195	6,458	-	7,515	6,744	6,673	6,672
289	6,457	-	7,515	6,741	6,663	6,646
473	6,457	7,377	7,515	6,738	6,651	6,643
847	6,458	7,418	7,515	6,735	6,643	6,627
1034	6,458	7,434	7,515	6,734	6,642	6,624
1404	6,458	7,444	7,515	6,734	6,642	6,619
2680	6,460	7,458	7,513	6,734	6,642	6,611
3395	6,461	7,463	7,511	6,734	6,642	6,610
4446	6,462	7,467	7,511	6,734	6,642	6,607
7149	6,463	7,468	7,511	6,734	6,642	6,607
16054	6,464	7,468	7,511	6,734	6,642	6,607
50130	6,464	7,470	7,511	6,734	6,642	6,607

**Tabelle 10: Chemische Verschiebung δ [ppm] der Signale H<sup>δ</sup> Y762/A und B, H<sup>ε</sup> Y762/A und B sowie H<sup>δ</sup> F738/B und H<sup>δ</sup> F759/A im Verlauf der Titration mit CaCl<sub>2</sub>. Kennzeichnung mit „-“ für Schritte, bei denen das Signal noch nicht detektierbar war**

Abbildung 26 zeigt vergrößert den Ausschnitt der  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der fünf Histidine im Verlauf der Titration. Tabelle 11 und Tabelle 12 zeigen die Populationen bzw. chemischen Verschiebungen für die verschiedenen Schritte. Die Zuordnung der  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der fünf Histidine wurde wie bereits in Abschnitt 4.1.1 nach Eberhardt gemäß ihrer Reihenfolge im Spektrum übertragen (Eberhardt, 2011). Hierbei konnten zwei Zustände für die  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine H750, H773, H709 und H775 festgestellt werden, wobei der höher populierte Zustand analog zu Y762 jeweils als Zustand A bezeichnet wurde. Bereits bei den Zuordnungsexperimenten wurden zwei Zustände für  $H^{\epsilon 1}$ -Signale von H750 und H773 beobachtet (4.1.1). Des Weiteren werden für das am C-Terminus gelegene H793 aufgrund der Integrale wie bereits in Abschnitt 4.1.1 drei Zustände vermutet, die wie in 4.1.1 bezeichnet wurden. Bei allen Titrationsschritten ergibt der Bereich der  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine ca. fünf Protonen bei Referenzierung auf Y684  $H^{\epsilon}$ .  $H^{\epsilon 1}$  H750/A und H750/B weisen im Verlauf der Titration ein Verhältnis von ca. 60 : 40 auf. Die H773  $H^{\epsilon 1}$  -Signale liegen ebenfalls in zwei Zuständen vor und bewegen sich in einem Populationverhältnis zwischen 60 : 40 und 50 : 50. Histidin 793  $H^{\epsilon 1}$  scheint zu ca. je ein Drittel in einem der drei Zustände A, B bzw. C vorzuliegen. Die zwei Zustände von  $H^{\epsilon 1}$  H709 überlagern wahrscheinlich, so dass nur ein Signal sichtbar ist, oder das Histidin liegt nur in einem Zustand vor. Das Integral von H775/B  $H^{\epsilon 1}$  nimmt Werte zwischen 0,4 und 0,6 Protonen an.  $H^{\epsilon 1}$  H775/A weist ein Integral von ca. 0,7 Protonen auf. Mit geringeren Kalziumkonzentrationen verbreitert das Signal stark und shiftet Richtung Tieffeld. Es wird in den Tabellen als H775/A\*  $H^{\epsilon 1}$  gekennzeichnet. H775/A  $H^{\epsilon 1}$  und B weisen in der Summe ein etwas zu großes Gesamtintegral für ein Proton auf.



**Abbildung 26:**  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine von PC2(680-796) bei pH 7.5 im Verlauf der Titration mit  $\text{CaCl}_2$

Messbedingungen:  $V = 500 \mu\text{l}$ ,  $74 \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ , pH 7.5, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 50  $\mu\text{M}$  DSS, 99,9 %  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit LB = 2.

CaCl2 [μM]	H750/A H <sup>ε1</sup>	H750/B H <sup>ε1</sup>	H773/A H <sup>ε1</sup>	H773/B H <sup>ε1</sup>	H775/B* H <sup>ε1</sup>	H793/A H <sup>ε1</sup>	H793/B H <sup>ε1</sup>	H793/C H <sup>ε1</sup>	H709/A H <sup>ε1</sup>	H709/B H <sup>ε1</sup>	H775/B H <sup>ε1</sup>	H775/A H <sup>ε1</sup>	Summe	
0	0,51	0,37	0,62	0,88		2,62							n.v.	4,99
40	0,58	0,39	0,67	0,90		2,28					0,39	n.v.	5,20	
98	0,61	0,47	0,69	0,39	2,44					0,61	n.v.	5,21		
137	0,57	0,44	0,66	0,40	2,43					0,62	n.v.	5,13		
195	0,58	0,44	1,03		2,47					0,61	n.v.	5,13		
289	0,61	0,43	0,92		2,46					0,61	n.v.	5,03		
473	0,62	0,45	1,05		n.v.	0,26	1,50			1,20		5,08		
847	0,61	0,43	0,96		n.v.	0,39	1,52			1,17		5,07		
1034	0,64	0,50	1,05		n.v.	0,27	0,46	0,99		1,17		5,09		
1404	0,63	0,46	0,97		n.v.	0,30	0,61	0,94		1,17		5,07		
2680	0,64	0,52	0,44	0,47	n.v.	0,27	0,69	0,74		0,60	0,70	5,08		
3395	0,75	0,54	0,50	0,49	n.v.	0,29	0,68	0,76		0,49	0,67	5,18		
4446	0,68	0,46	0,41	0,42	n.v.	0,30	0,68	0,73		0,51	0,71	4,90		
7149	0,66	0,53	0,52	0,41	n.v.	0,29	0,69	0,76		0,54	0,74	5,14		
16054	0,72	0,55	0,46	0,45	n.v.	0,31	0,65	0,75		0,58	0,71	5,18		
50130	0,65	0,57	0,36	0,52	n.v.	0,25	0,65	0,78		0,50	0,77	5,06		

**Tabelle 11: Populationen der Signale fünf Histidine in ihren Zuständen im Verlauf der Titration mit CaCl<sub>2</sub> bei Referenzierung auf das Integral von Y684 H<sup>ε</sup>**

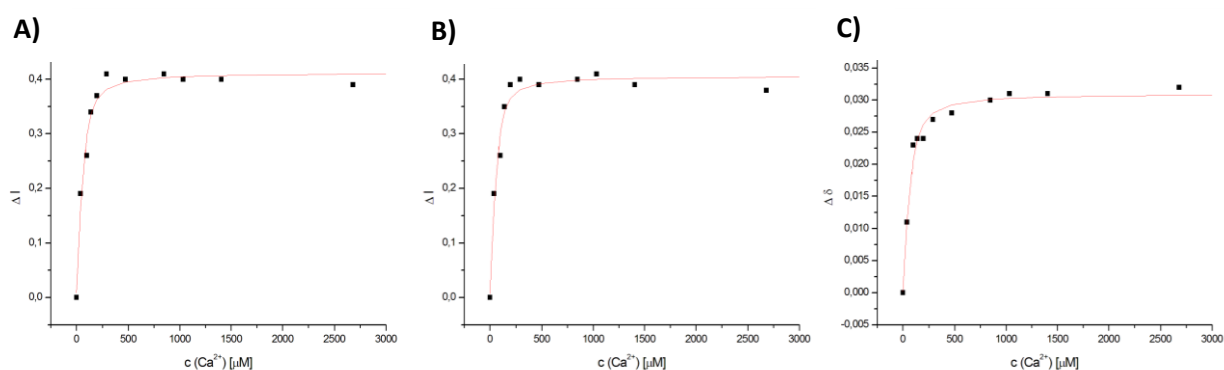
H<sup>ε1</sup> H775/B verbreitert und wandert bei geringeren Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen Richtung Tieffeld und überlagert dabei mit anderen Signalen. In deren Integralen ist H<sup>ε1</sup> H775/A enthalten und wird hier als H<sup>ε1</sup> H775/B\* gekennzeichnet. Wenn Peak nicht vorhanden wird „n.v.“ in das Feld eingetragen.

CaCl <sub>2</sub> [μM]	H <sup>ε1</sup> H750/A	H <sup>ε1</sup> H750/B	H <sup>ε1</sup> H773/A	H <sup>ε1</sup> H773/B	H <sup>ε1</sup> H775/A*	H <sup>ε1</sup> H793/A	H <sup>ε1</sup> H793/B	H <sup>ε1</sup> H793/C	H <sup>ε1</sup> H709/A	H <sup>ε1</sup> H709/B	H <sup>ε1</sup> H775/B	H <sup>ε1</sup> H775/A
0	8,001	7,987	7,855	7,837	(7,85-7,82)	7,782	7,759	7,749	7,728		(7,696)	n.v.
40	8,001	7,965	7,853	7,833	(7,88-7,80)	7,783	7,757	7,748	7,728		7,685	n.v.
98	8,003	7,948	7,849	7,833	(7,809)	7,782	7,755	7,749	7,730		7,673	n.v.
137	8,005	7,942	7,846	7,833	(7,80-7,70)	7,782	7,755	7,748	7,731		7,672	n.v.
195	8,005	7,940	7,839		(7,80-7,70)	7,781	7,755	7,748	7,733		7,672	n.v.
289	8,007	7,937	7,834		(7,81-7,69)	7,779	7,755		7,735		7,668	n.v.
473	8,011	7,933	7,830		n.v.	7,780	7,753		7,738		7,668	7,676
847	8,008	7,932	7,825		n.v.	7,781	7,752		7,739		7,666	7,666
1034	8,006	7,929	7,823		n.v.	7,778	7,751		7,739		7,662	7,662
1404	8,002	7,926	7,820		n.v.	7,779	7,750		7,737		7,652	7,653
2680	7,989	7,918	7,822	7,814	n.v.	7,780	7,750		7,732		7,664	7,641
3395	7,982	7,915	7,822	7,812	n.v.	7,777	7,750		7,730		7,664	7,638
4446	7,974	7,911	7,820	7,810	n.v.	7,777	7,750		7,726		7,664	7,636
7149	7,974	7,911	7,820	7,810	n.v.	7,777	7,750		7,727		7,664	7,635
16054	7,974	7,911	7,819	7,810	n.v.	7,777	7,750		7,727		7,662	7,635
50130	7,976	7,911	7,820	7,810	n.v.	7,777	7,749		7,727		7,664	7,635

**Tabelle 12: Chemische Verschiebung δ [ppm] der Signale der fünf Histidine in ihren Zuständen im Verlauf der Titration mit CaCl<sub>2</sub>**

H<sup>ε1</sup> H775/A verbreitert und wandert bei geringeren Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen Richtung Tieffeld und überlagert dabei mit anderen Signalen. Es wird hier als H<sup>ε1</sup> H775/B\* gekennzeichnet, aufgrund der starken Verbreiterung und Überlagerungen können meist nur ppm-Bereiche und keine eindeutigen Werte angegeben werden (Werte in Klammern). Unsicherer Einzelwert für H<sup>ε1</sup> H775/A ebenfalls in Klammern dargestellt. Wenn Peak nicht vorhanden wird „n.v.“ in das Feld eingetragen.

Um die im Verlauf der Titration vorhandenen Prozesse zu beschreiben, wurden insgesamt sieben Markersignale identifiziert. Diese wurden in drei Gruppen geclustert. Für jedes beobachtete Signal wurden die chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  oder die Integrale  $\Delta I$  gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen. Die Signale aus Gruppe 1 zeigen  $K_D$ -Werte für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von  $19 \pm 4 \mu\text{M}$  für F738/B  $\text{H}^\delta$ ,  $17 \pm 4 \mu\text{M}$  für Y762/B  $\text{H}^\delta$  und  $30 \pm 5 \mu\text{M}$  für H775/B  $\text{H}^{\epsilon 1}$ . In Abbildung 27 sind die Fits dargestellt, Tabelle 13 zeigt die  $K_D$ -Werte.



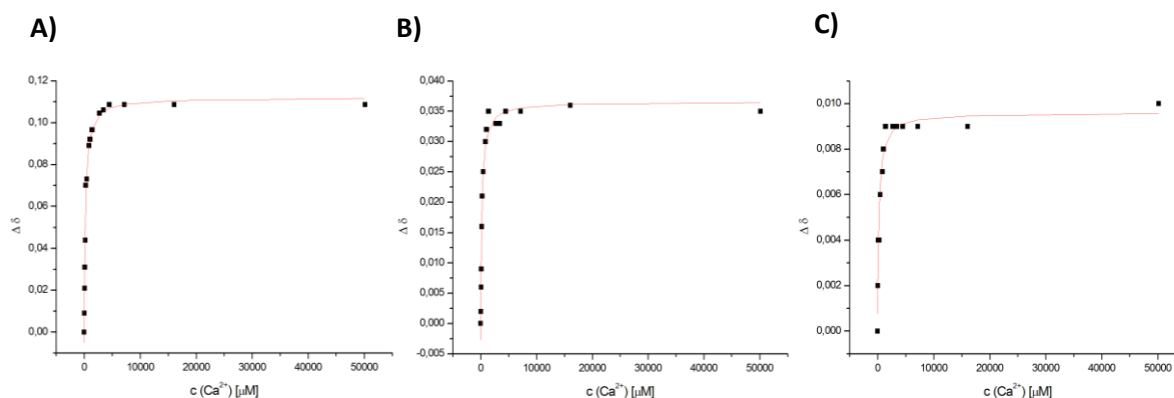
**Abbildung 27: Gruppe 1 der  $K_D$ -Werte:  $\Delta I$  von F738/B  $\text{H}^\delta$  (A),  $\Delta I$  von Y762/B  $\text{H}^\delta$  (B) und  $\Delta\delta$  von H775/B  $\text{H}^{\epsilon 1}$  (C) gegen die  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration aufgetragen und mit Formel 4 bzw. Formel 5 gefittet**

Messbedingungen:  $V = 500 \mu\text{l}$ ,  $74 \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $20 \text{ mM Tris}$ ,  $150 \text{ mM KCl}$ ,  $1 \text{ mM DTT}$ ,  $50 \mu\text{M DSS}$ ,  $99,9 \%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem  $600 \text{ MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen.

	$K_D$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]
<b>F738/B <math>\text{H}^\delta</math></b>	$19 \pm 4$
<b>Y762/B <math>\text{H}^\delta</math></b>	$17 \pm 4$
<b>H775/B <math>\text{H}^{\epsilon 1}</math></b>	$30 \pm 5$

**Tabelle 13: Gruppe 1 der  $K_D$ -Werte: Berechnung der  $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen**

Die Signale aus Gruppe 2 zeigen  $K_D$ -Werte für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von  $205 \pm 25 \mu\text{M}$  für F759/A  $\text{H}^\delta$ ,  $188 \pm 30 \mu\text{M}$  für H773/A  $\text{H}^{\epsilon 1}$  und  $259 \pm 60 \mu\text{M}$  für H793/B  $\text{H}^{\epsilon 1}$ . In Abbildung 28 sind die Fits dargestellt, Tabelle 14 zeigt die  $K_D$ -Werte.



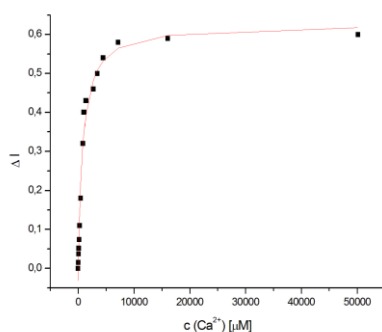
**Abbildung 28: Gruppe 2 der  $K_D$ -Werte:  $\Delta\delta$  von F759/A  $H^6$  (A),  $\Delta\delta$  von H773/A  $H^{\epsilon 1}$  (B) und  $\Delta\delta$  von H793/B  $H^{\epsilon 1}$  (C) gegen die  $CaCl_2$ -Konzentration aufgetragen und mit Formel 5 gefittet**

Messbedingungen:  $V = 500 \mu l$ ,  $74 \mu M$  PC2(680-796),  $T = 298K$ ,  $pH 7.5$ ,  $20 mM$  Tris,  $150 mM$  KCl,  $1 mM$  DTT,  $50 \mu M$  DSS,  $99,9\%$   $D_2O$ . Die Daten wurden mit einem  $600 MHz$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen.

	$K_D$ -Wert [ $\mu M$ ]
F759/A $H^6$	$205 \pm 25$
H773/A $H^{\epsilon 1}$	$188 \pm 30$
H793/B $H^{\epsilon 1}$	$259 \pm 60$

**Tabelle 14: Gruppe 2 der  $K_D$ -Werte: Berechnung der  $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für  $Ca^{2+}$ -Ionen**

Y762/A  $H^6$  steht für Gruppe 3 und zeigt einen  $K_D$ -Wert für  $Ca^{2+}$ -Ionen von  $738 \pm 99 \mu M$  an. Für geringe Kalziumkonzentrationen wurde der Kurvenverlauf mit dem Programm Origin 6.0 linear extrapoliert, da hier der Peak zu stark verbreitert war, um das Integral noch auswerten zu können. In Abbildung 29 ist der Fit dargestellt, Tabelle 15 zeigt den  $K_D$ .



**Abbildung 29: Gruppe 3:  $\Delta I$  von  $H^6$  Y762/A gegen die  $CaCl_2$ -Konzentration aufgetragen und mit Formel 4 gefittet**

Messbedingungen:  $V = 500 \mu l$ ,  $74 \mu M$  PC2(680-796),  $T = 298K$ ,  $pH 7.5$ ,  $20 mM$  Tris,  $150 mM$  KCl,  $1 mM$  DTT,  $50 \mu M$  DSS,  $99,9\%$   $D_2O$ . Die Daten wurden mit einem  $600 MHz$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Für geringe Kalziumkonzentrationen wurde der Kurvenverlauf mit dem Programm Origin 6.0 linear extrapoliert.

	$K_D$ -Wert [ $\mu M$ ]
Y762/A $H^6$	$738 \pm 99$

**Tabelle 15: Gruppe 3 der  $K_D$ -Werte: Berechnung der  $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für  $Ca^{2+}$ -Ionen**



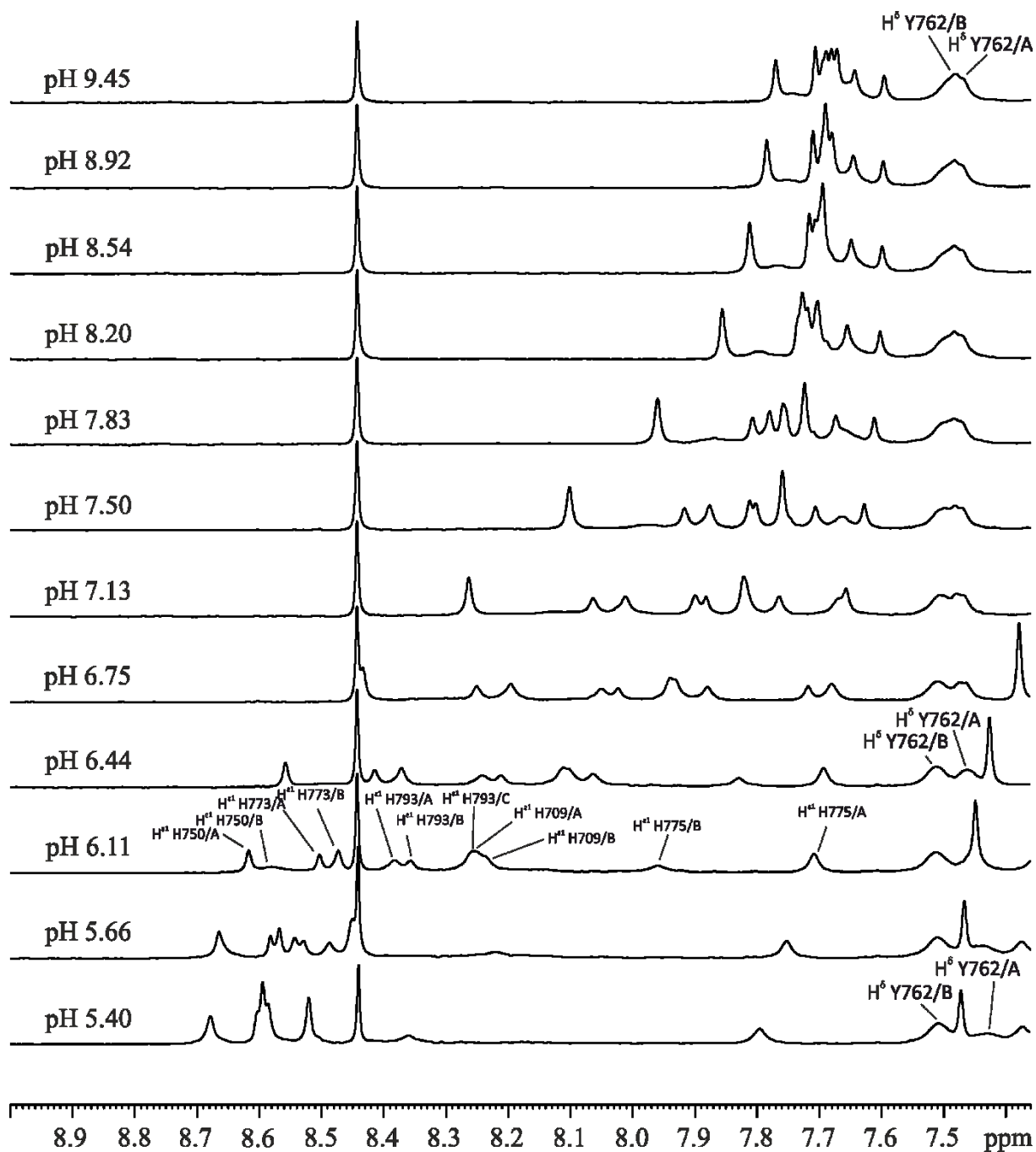
Aufgrund der drei auftretenden Gruppen von  $K_D$ -Werten wurde eine Formel für ein Modell erstellt, das zusätzlich zu den zwei bekannten von einem dritten  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsplatz ausgeht (Schumann et al., 2009a). Dafür wurde aus jeder Gruppe der Fit mit dem geringsten Fehler unter Verwendung der Formel für einen Bindungsplatz (Formel 4 bzw. Formel 5) ausgewählt. Dies sind die Signale F738/B  $\text{H}^\delta$ , F759/A  $\text{H}^\delta$  und Y762/A  $\text{H}^\delta$ . Das Modell für drei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsplätze schließt in die Berechnung mit ein, dass bereits gebundene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen den anderen Bindungsplätzen nicht mehr zur Verfügung stehen (Formel 8, Formel 9, Formel 10). Die Änderungen der Integrale  $\Delta I$  bzw. der chemischen Verschiebungen  $\Delta\delta$  der Signale wurden gegen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration aufgetragen wurden nun simultan mit Formel 8, Formel 9 und Formel 10 gefittet. Tabelle 16 zeigt die berechneten  $K_D$ -Werte für die drei Bindungsplätze für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

BP	AS	$K_D$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]
1	F738/B $\text{H}^\delta$	$10 \pm 2$
2	F759/A $\text{H}^\delta$	$137 \pm 18$
3	Y762/A $\text{H}^\delta$	$612 \pm 72$

Tabelle 16: Berechnung der  $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit dem Modell für 3 Bindungsplätze

#### 4.1.4 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste in Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

Im Folgenden sollten die Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(680-796) sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bestimmt werden. Dazu werden die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine H709, H750, H773, H775 und H793 im Verlauf der pH-Titrations beobachtet und deren chemische Verschiebung gegen den pH-Wert aufgetragen. Die Säurekonstanten von Histidinen in Proteinen geben Einblick in ihre chemische Umgebung und Funktion (Tanokura, 1983). H709 liegt in einem vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Bereich 18 AS vor EF-Hand 1 und H750 befindet sich im Linker zwischen den beiden EF-Händen. H773 liegt in der Sequenz in EF-Hand 2 und H775 direkt dahinter. H793 liegt im Bereich des ERR-Signals (1.5.1).



**Abbildung 30:** 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von PC2(680-796) mit 40.5 mM  $\text{CaCl}_2$  in der Probe: Die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine shiften mit steigendem pH. Das Signal von Y762  $\text{H}^{\delta}$  ist bei niedrigen pH-Werten aufgepalten.

Messbedingungen: V = 660  $\mu\text{L}$ , 67  $\mu\text{M}$  PC2(680-796), T = 298K, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 40.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM DTT, 200  $\mu\text{M}$  DSS, in 99,9%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit LB = 2.00.

Bei der pH-Titration von PC2(680-796) konnten insgesamt 11 Signale im Bereich der  $\text{H}^{\epsilon 1}$  der fünf Histidine beobachtet werden. Im alkalischen pH-Bereich überlagern die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale verstärkt. Das Gesamtintegral dieser 11 Signale betrug während der gesamten Titration ca. fünf Protonen (Tabelle 17). Bei den ersten beiden Titrationsschritten (pH 5,40 und 5,66) fällt das Gesamtintegral etwas zu niedrig aus. In Abbildung 30 ist wieder zu erkennen, dass die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der fünf Histidine mindestens zwei Zustände aufweisen. Die Zuordnung der Zustände der Histidin-Signale erfolgte wie in Abschnitt 4.1.3. für die Kalziumtitration beschrieben. Eines der fünf Histidine, vermutlich

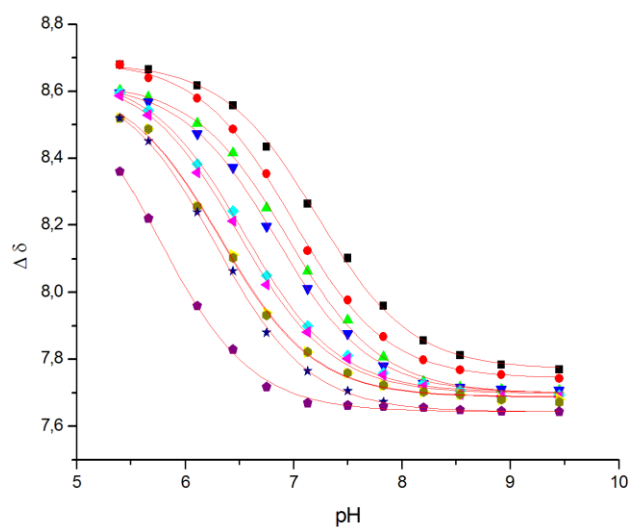
wiederum H793 H<sup>ε1</sup>, muss aufgrund der 11 detektierten Signale in drei statt zwei Zuständen vorliegen. Die zwei Zustände von H750 H<sup>ε1</sup> bilden in der Summe annähernd ein Gesamtintegral von einem Proton, wobei Zustand A überwiegt (ca. 70:30, vgl. Tabelle 17). Bei H773 H<sup>ε1</sup> scheint im Verlauf der Titration mit Ausnahme des stark basischen Bereichs Zustand B mit ca. 60 Prozent etwas stärker vertreten zu sein. H793 H<sup>ε1</sup> lag in den Zuordnungsexperimenten (4.1.1) in drei Zuständen vor. Aus diesem Grund und aufgrund des Gesamtintegrals von annähernd einem Proton für die drei H793 H<sup>ε1</sup>-Signale wird der Peak bei 8,111 ppm bei pH 6,44 Zustand C des H793 H<sup>ε1</sup>-Signal zugeordnet, obwohl er näher bei den ppm-Werten von H709 H<sup>ε1</sup> liegt und teilweise mit Zustand A von H709 H<sup>ε1</sup> überlagert. Auch für H<sup>ε1</sup> H709 A und B ergibt sich dann ein stimmiges Gesamtintegral von ca. einem Proton. H775/B H<sup>ε1</sup> und H775/A H<sup>ε1</sup> sind im Verhältnis von 40:60 bis 50:50 vertreten. Beim Signal H775/A H<sup>ε1</sup> (z.B. bei 7.80 ppm bei pH 5.40) konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um das H<sup>δ2</sup> von H750/A handelt. Das H<sup>δ2</sup>-Signal von H750/A befindet sich bei pH 5.4 bei 7.47 ppm und weist fast den exakt gleichen pK-Wert wie H750/A H<sup>ε1</sup> auf. Das H<sup>δ2</sup> H750/B H<sup>δ2</sup> -Signal befindet sich bei pH 5.4 bei 7.37 ppm, kann jedoch aufgrund von Überlagerungen nicht über den gesamten Verlauf der Titration verfolgt werden. Für die Referenzierung der Integrale wurde wie schon bei der Titration mit Kalziumionen das Integral von Y684 H<sup>ε</sup> verwendet (vgl. 4.1.3). Generell treten viele Signalüberlagerungen auf, sodass die oft ein Gesamtintegral von zwei sich überlagernden Signale in die Tabelle aufgenommen wurde (Tabelle 17). Tabelle 18 zeigt die chemischen Verschiebungen der H<sup>ε1</sup>-Signale der Histidine von PC2(680-796) im Verlauf der pH-Titration. In Abbildung 31, Abbildung 32 und Abbildung 33 wurden die chemische Verschiebungen der Histidine gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 bzw. Formel 3 gefittet. H750 H<sup>ε1</sup> weist mit 7,22 für Zustand A und 6,99 für Zustand B die höchsten pK-Werte auf (Tabelle 19). Das H<sup>δ2</sup> von H750/A zeigt einen pK-Wert von 7,21 an. H773/A H<sup>ε1</sup> und H773/B H<sup>ε1</sup> zeigen pK-Werte von 6,94 bzw. 6,83 an. Für H793 H<sup>ε1</sup> wurden aufgrund der drei vorhandenen Zustände die drei pK-Werte 6,54 und 6,49 und 6,33 ermittelt. Für H<sup>ε1</sup> H709 A und B wurden die pK-Werte 6,32 bzw. 6,28 berechnet. Für H775/B H<sup>ε1</sup> wurde ein pK-Wert von 5,75 ermittelt. H775/A H<sup>ε1</sup> zeigt zwei verschiedene pK-Werte an. Zum einen scheint es den Prozess bei H750/A H<sup>ε1</sup> abzubilden (pK 7,21 bei H775/A H<sup>ε1</sup> und pK 7,22 bei H750/A H<sup>ε1</sup>). Ein zweiter pK-Wert von H<sup>ε1</sup> H775/A ist mit 4,45 sehr niedrig zeigt höchstwahrscheinlich einen der niedrigeren pK-Werte eines anderen Histidins in Zustand A an, wobei dieser pK-Wert als relativ unsicher betrachtet werden muss (zur Auswertung dieses pK-Wertes vgl. Tabelle 19). Typische pK-Werte für Histidine in Proteinen sind nach Markley et al. im Bereich von 6,72 ± 0,02 bis 5,79 ± 0,07 zu finden (Markley, 1975). Die ermittelten pK-Werte der fünf Histidine mit ihren zwei Zuständen bewegen sich mit Ausnahme von H<sup>ε1</sup> H750, das mit 7,22 ± 0,02 für beide Zustände etwas darüber liegt, mehr oder weniger in diesem Bereich.

	Population												
	H750 H <sup>ε1</sup>		H773 H <sup>ε1</sup>		H793 H <sup>ε1</sup>			H709 H <sup>ε1</sup>		H775 H <sup>ε1</sup>			
pH	A	B	A	B	A	B	C	A	B	B	A	Summe	
5,40	0,81		1,64				0,86			0,49	0,62	4,42	
5,66	0,80		0,32	0,42	0,35	0,35	0,38	0,85		0,56	0,61	4,63	
6,11	0,42	0,35	0,36	0,42	0,42	0,37	1,70		0,50	0,62	5,16		
6,44	0,41	0,32	0,37	0,54	0,45	0,31	0,95		0,46	0,48	0,64	4,93	
6,75	0,68	0,38	0,39	0,64	0,43	0,34	0,91		0,49	0,36	0,67	5,30	
7,13	0,78	0,35	0,45	0,60	0,41	0,37	1,04		0,47	0,86		5,35	
7,50	0,79	0,28	0,43	0,56	0,35	0,38	0,93		0,43	0,40	0,39	4,90	
7,83	0,74	0,29	0,42	0,56	0,70		0,97		0,84		0,37	4,90	
8,20	0,77	0,31	1,60				1,18		0,97		0,46	5,28	
8,54	0,84	0,39	0,64	2,08						0,93		0,49	5,36
8,92	0,77	0,28	0,74	1,91						0,89		0,49	5,08
9,45	0,77	0,32	0,63	1,97						0,76		0,49	4,94

Tabelle 17: Populationen der Histidine im Verlauf der pH-Titration

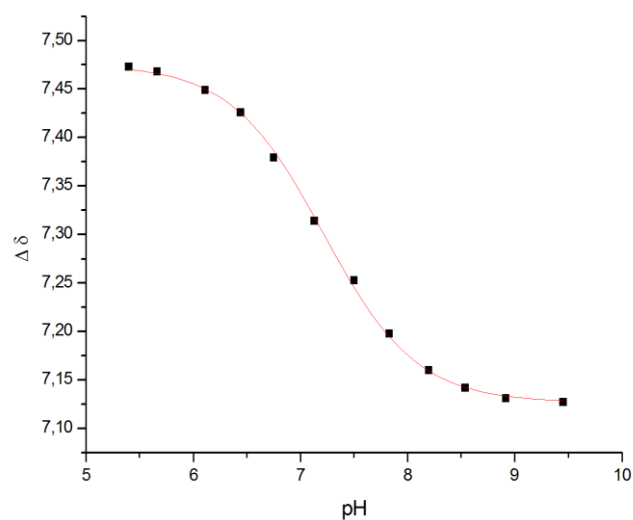
	Chemische Verschiebung $\delta$ [ppm]											
	H750 H <sup>ε1</sup>		H773 H <sup>ε1</sup>		H793 H <sup>ε1</sup>			H709 H <sup>ε1</sup>		H775 H <sup>ε1</sup>		H750 H <sup>δ2</sup>
pH	A	B	A	B	A	B	C	A	B	B	A	A
5,40	8,679	8,679	8,603	8,595	8,595	8,587	8,520	8,520	8,520	8,360	7,796	7,473
5,66	8,665	8,640	8,582	8,568	8,543	8,529	8,487	8,487	8,451	8,220	7,753	7,468
6,11	8,617	8,579	8,504	8,473	8,383	8,357	8,256	8,256	8,239	7,960	7,708	7,449
6,44	8,558	8,487	8,415	8,372	8,242	8,212	8,111	8,103	8,064	7,830	7,693	7,426
6,75	8,434	8,353	8,251	8,196	8,051	8,023	7,939	7,932	7,880	7,718	7,680	7,379
7,13	8,263	8,123	8,064	8,012	7,900	7,882	7,822	7,822	7,765	7,670	7,657	7,314
7,50	8,102	7,977	7,917	7,877	7,812	7,802	7,759	7,759	7,706	7,663	7,628	7,253
7,83	7,960	7,868	7,807	7,780	7,759	7,754	7,723	7,723	7,673	7,659	7,612	7,198
8,20	7,856	7,798	7,734	7,728	7,728	7,719	7,703	7,703	7,656	7,656	7,602	7,160
8,54	7,812	7,768	7,716	7,716	7,707	7,695	7,695	7,695	7,649	7,649	7,599	7,142
8,92	7,784	7,754	7,710	7,710	7,690	7,690	7,680	7,680	7,645	7,645	7,597	7,131
9,45	7,770	7,743	7,707	7,707	7,693	7,689	7,681	7,672	7,644	7,644	7,596	7,127

Tabelle 18: Chemische Verschiebungen  $\delta$  der H<sup>ε1</sup>- bzw. der H<sup>δ2</sup>-Signale der Histidine im Verlauf der pH-Titration



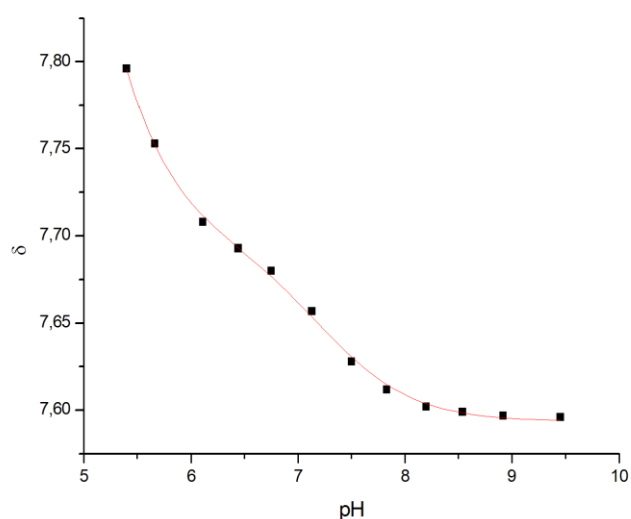
**Abbildung 31: Chemische Verschiebungen  $\delta$  der Histidine gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet**

$H^{\epsilon 1}$  H750/A schwarz,  $H^{\epsilon 1}$  H750/B rot,  $H^{\epsilon 1}$  H773/A grün,  $H^{\epsilon 1}$  H773/B blau,  $H^{\epsilon 1}$  H793/A türkis,  $H^{\epsilon 1}$  H793/B magenta,  $H^{\epsilon 1}$  H709/A gelb,  $H^{\epsilon 1}$  H709/B dunkelgrün,  $H^{\epsilon 1}$  H709/C dunkelblau,  $H^{\epsilon 1}$  H775/B lila.  $H^{\epsilon 1}$  H775/A und  $H^{\delta 2}$  H750/A sind nicht in Abbildung enthalten und werden separat dargestellt. Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 67  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 40.5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, in 99,9%  $D_2O$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen.



**Abbildung 32: Chemische Verschiebung  $\delta$  von  $H^{\delta 2}$  H750/A gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet**

Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 67  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 40.5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, in 99,9%  $D_2O$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen.



**Abbildung 33: Chemische Verschiebung  $\delta$  von  $H^{\epsilon 1}$  H775/A gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 3 für zwei pK-Werte gefittet**

Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 67  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 40.5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, in 99,9%  $D_2O$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen.

	$H^{\epsilon 1}$ H750/A	$H^{\epsilon 1}$ H750/B	$H^{\epsilon 1}$ H773/A	$H^{\epsilon 1}$ H773/B	$H^{\epsilon 1}$ H793/A
<b>pK-Wert</b>	$7,22 \pm 0,02$	$6,99 \pm 0,02$	$6,94 \pm 0,02$	$6,83 \pm 0,02$	$6,54 \pm 0,02$
<b><math>\Delta\delta</math></b>	$0,92 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,02$
<b><math>\delta_{HA}</math></b>	$8,69 \pm 0,01$	$8,69 \pm 0,01$	$8,63 \pm 0,01$	$8,63 \pm 0,01$	$8,65 \pm 0,01$
<b><math>\delta_{A^-}</math></b>	$7,77 \pm 0,01$	$7,74 \pm 0,01$	$7,70 \pm 0,00$	$7,70 \pm 0,01$	$7,70 \pm 0,01$

	$H^{\epsilon 1}$ H793/B	$H^{\epsilon 1}$ H793/C	$H^{\epsilon 1}$ H709/A	$H^{\epsilon 1}$ H709/B	$H^{\epsilon 1}$ H775/B
<b>pK-Wert</b>	$6,49 \pm 0,02$	$6,33 \pm 0,02$	$6,32 \pm 0,02$	$6,28 \pm 0,02$	$5,75 \pm 0,04$
<b><math>\Delta\delta</math></b>	$0,95 \pm 0,02$	$0,94 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,02$	$1,05 \pm 0,05$
<b><math>\delta_{HA}</math></b>	$8,65 \pm 0,01$	$8,63 \pm 0,02$	$8,63 \pm 0,01$	$8,64 \pm 0,01$	$8,69 \pm 0,04$
<b><math>\delta_{A^-}</math></b>	$7,70 \pm 0,01$	$7,69 \pm 0,01$	$7,69 \pm 0,01$	$7,64 \pm 0,01$	$7,64 \pm 0,01$

	$H^{\epsilon 1}$ H775/A
<b>pK-Wert 1*</b>	$4,45 \pm 0,02$
<b>pK-Wert 2</b>	$7,21 \pm 0,06$
<b><math>\delta_0</math></b>	$8,69 \pm 0,00$
<b><math>\delta_1</math></b>	$7,70 \pm 0,00$
<b><math>\delta_2</math></b>	$7,59 \pm 0,00$

	$H^{\delta 2}$ H750/A
<b>pK-Wert</b>	$7,21 \pm 0,02$
<b><math>\Delta\delta</math></b>	$0,27 \pm 0,02$
<b><math>\delta_{HA}</math></b>	$7,48 \pm 0,00$
<b><math>\delta_{A^-}</math></b>	$7,21 \pm 0,02$

**Tabelle 19: pK-Werte der Histidine von PC2(680-796) in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  - Ionen**

Die Daten wurden mit Formel 2 für einen bzw. mit Formel 3 für zwei pK-Werte gefittet.  $\delta_{HA}$  chemische Verschiebung der vollprotonierten Form,  $\delta_{A^-}$  chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form,  $\Delta\delta$  Differenz  $\delta_{HA} - \delta_{A^-}$ . Fit für H775/A: Um pK-Wert 1\* für  $H^{\epsilon 1}$  H775/A fitten zu können, wurde für  $\delta_0^*$  der Wert 8,69 aus  $H^{\epsilon 1}$  H775/A eingesetzt.  $\delta$  chemische Verschiebung,  $\delta_0$  chemische Verschiebung der vollprotonierten Form,  $\delta_1$  chemische Verschiebung der halbprotonierten Form,  $\delta_2$  chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form.

Y762/A  $H^\delta$  und Y762/B  $H^\delta$  sind bei niedrigem pH als zwei getrennte Peaks zu identifizieren, Y762/B  $H^\delta$  shiftet mit steigendem pH in Richtung Hochfeld während Y762/A  $H^\delta$  Richtung Tieffeld wandert. Als Folge dessen überlagern sich beide Signale und sind ab pH 8,20 nur noch als gemeinsamer Peak erkennbar (Abbildung 30, Tabelle 20). Y762/B  $H^\delta$  ist wie schon aus der Kalziumtitration und den Zuordnungsexperimenten bekannt stark verbreitert. Während der gesamten Titration scheint Y762/B  $H^\delta$  zu ca. 50 % populierte zu sein, auch wenn die Zustände ab pH 8,20 nicht mehr getrennt ausgewertet werden können. Es scheint sich ab pH 7,13 ein Verhältnis von 50 zu 50 % von Zustand B und A von Y762  $H^\delta$  einzupendeln. Das Gesamtintegral ergibt dann immer annähernd zwei Protonen. Bei den niedrigeren pH-Werten ist Zustand A weniger stark vertreten, bei pH 5,40 nur zu 28 % populierte. Zustand A von Y762  $H^\delta$  ist wie aus der Kalziumtitration bekannt erst bei höheren Kalziumkonzentrationen voll populierte. Der niedrige pH verringert die Affinität für  $Ca^{2+}$ -Ionen und führt zu der niedrigeren Population des für  $Ca^{2+}$ -Ionen weniger affinen Zustands A von Y762  $H^\delta$ . Bei pH 6,11 konnte Zustand A nicht ausgewertet werden, da er hier von einem anderen Signal verdeckt wird. F738/B  $H^\delta$  ist zu 50-60 % populierte. Y762/B  $H^\delta$  ist mit ca. 50 % ähnlich stark populierte. Die Populationen von Y762/B  $H^\delta$  und F738/B  $H^\delta$  reagieren nicht auf die pH-Veränderungen. Es ist aus der Kalziumtitration bekannt, dass diese Zustände schon bei geringen Kalziumkonzentration ihre Maximalpopulation erreichen. Es befinden sich 40,5 mM  $CaCl_2$  in der Probe. Bei den niedrigsten pH-Werten in dieser Titrationsreihe zeigt nur Y762/A  $H^\delta$  eine Verminderung des Integrals. Der pH-Wert von 5,40 setzt die Affinität für  $Ca^{2+}$ -Ionen nicht soweit herab, dass bei 40,5 mM Kalzium in der Probe auch eine Sättigung von Y762  $H^\delta$ /B und F738  $H^\delta$ /B verhindert wird. F759  $H^\delta$ /A und Y762  $H^\epsilon$ /B weisen beide eine im Verlauf der Titration konstante Population von ca. 50 % auf (nicht in Tabelle).

	Population			
pH	Y762/B $H^\delta$	Y762/A $H^\delta$	Summe Y762/A + B $H^\delta$	F738/B $H^\delta$
5,40	0,57	0,28	0,85	0,59
5,66	0,55	0,29	0,84	0,58
6,11	0,55	-	-	0,56
6,44	0,52	0,35	0,87	0,56
6,75	0,49	0,44	0,93	0,61
7,13	0,47	0,46	0,93	0,60
7,50	0,43	0,48	0,91	0,59
7,83	0,48	0,46	0,94	0,56
8,20	0,85		0,85	0,59
8,54	0,94		0,94	0,62
8,92	0,91		0,91	0,58
9,45	0,85		0,85	0,54

Tabelle 20: Populationen von Y762/A  $H^\delta$  und B, F738  $H^\delta$  im Verlauf der pH-Titration

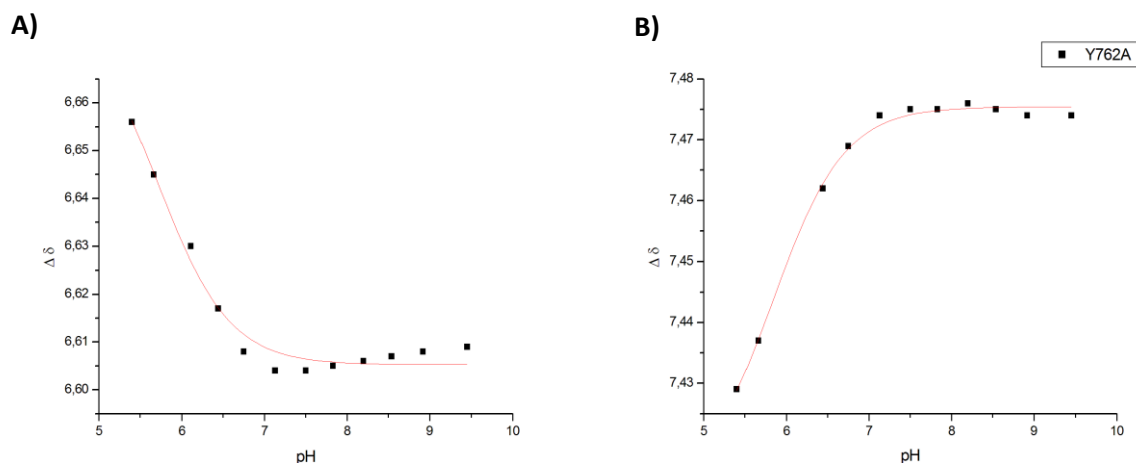
Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  der Signale  $H^\delta$  Y762/A und B sowie F738/B  $H^\delta$  und F759/A  $H^\delta$ , der Markersignale für die Bindungsplätze für  $Ca^{2+}$ -Ionen (vgl. 4.1.3) wurden gegen den pH aufgetragen und mit Formel 2 bzw. Formel 3 gefittet (Tabelle 21, Abbildung 34, Abbildung 35). F759/A  $H^\delta$  und Y762/A  $H^\delta$  weisen mit 5,71 bzw. 5,83 relativ niedrige pK-Werte auf. F738/B  $H^\delta$  und Y762/B  $H^\delta$  zeigen zwei pK-Werte. Zum einen einen höheren (pK-Werte 6,96 bzw. 7,13) im Bereich des pK von H750/B.

Zum anderen einen jeweils einen sehr niedrigen pK-Wert (4,85 bzw. 5,37) im Bereich von H<sup>ε1</sup> H775/B (Tabelle 22, Tabelle 23).

Chemische Verschiebung $\delta$ [ppm]				
pH	Y762 H <sup>δ</sup> /B	Y762 H <sup>δ</sup> /A	F738 H <sup>δ</sup> /B	F759 H <sup>δ</sup> /A
5,40	7,508	7,429	6,465	(6,656)
5,66	7,511	7,437	6,453	(6,645)
6,11	7,512	-	6,446	6,63
6,44	7,512	7,462	6,445	6,617
6,75	7,51	7,469	6,454	6,608
7,13	7,504	7,474	6,465	6,604
7,50	7,498	7,475	6,471	6,604
7,83	7,498	7,475	6,478	6,605
8,20	7,492	7,476	6,482	6,606
8,54	7,492	7,475	6,483	6,607
8,92	7,492	7,474	6,485	6,608
9,45	7,492	7,474	6,484	6,609

**Tabelle 21: Chemische Verschiebungen von H<sup>δ</sup> von Y762/A und B sowie F738 H<sup>δ</sup> und F759/A H<sup>δ</sup>**

„-“ = Signal nicht auswertbar.



**Abbildung 34: Shifts von (A) F759/A H<sup>δ</sup> und (B) Y762/A H<sup>δ</sup> gegen den pH aufgetragen und mit Formel 2 gefittet**

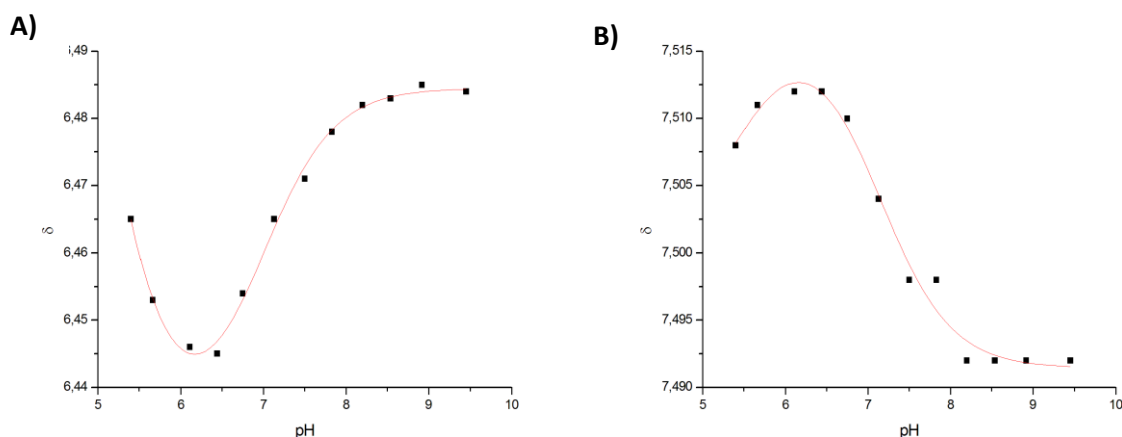
Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 67  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 40.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, in 99,9% D<sub>2</sub>O. Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen.

	F759 H <sup>δ</sup> /A	Y762 H <sup>δ</sup> /A
<b>pK-Wert</b>	5,71 $\pm$ 0,13	5,83 $\pm$ 0,06
<b><math>\Delta\delta</math></b>	0,07 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,00
<b><math>\delta_{HA}</math></b>	6,68 $\pm$ 0,01	7,41 $\pm$ 0,00
<b><math>\delta_{A^-}</math></b>	6,61 $\pm$ 0,00	7,47 $\pm$ 0,00

**Tabelle 22: pK-Werte für F759/A H<sup>δ</sup> und Y762/A H<sup>δ</sup>**

$\delta_{HA}$  chemische Verschiebung der vollprotonierten Form,  $\delta_{A^-}$  chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form,  $\Delta\delta$  Differenz  $\delta_{HA} - \delta_{A^-}$ .





**Abbildung 35: Shifts von (A) F738/B  $H^\delta$  und (B) Y762/B  $H^\delta$  gegen den pH aufgetragen und mit Formel 3 gefittet**  
 Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 67  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 40.5 mM  $CaCl_2$ , 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, in 99,9%  $D_2O$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen.

	F738 $H^\delta/B$	Y762 $H^\delta/B$
<b>pK-Wert 1</b>	$4,85 \pm 0,58$	$5,37 \pm 0,91$
<b>pK-Wert 2</b>	$6,96 \pm 0,07$	$7,13 \pm 0,13$
<b><math>\delta_{HA1}</math></b>	$6,58 \pm 0,15$	$7,52 \pm 0,00$
<b><math>\delta_{HA2}</math></b>	$6,48 \pm 0,00$	$7,50 \pm 0,02$
<b><math>\delta_{A^-}</math></b>	$6,43 \pm 0,00$	$6,49 \pm 0,00$

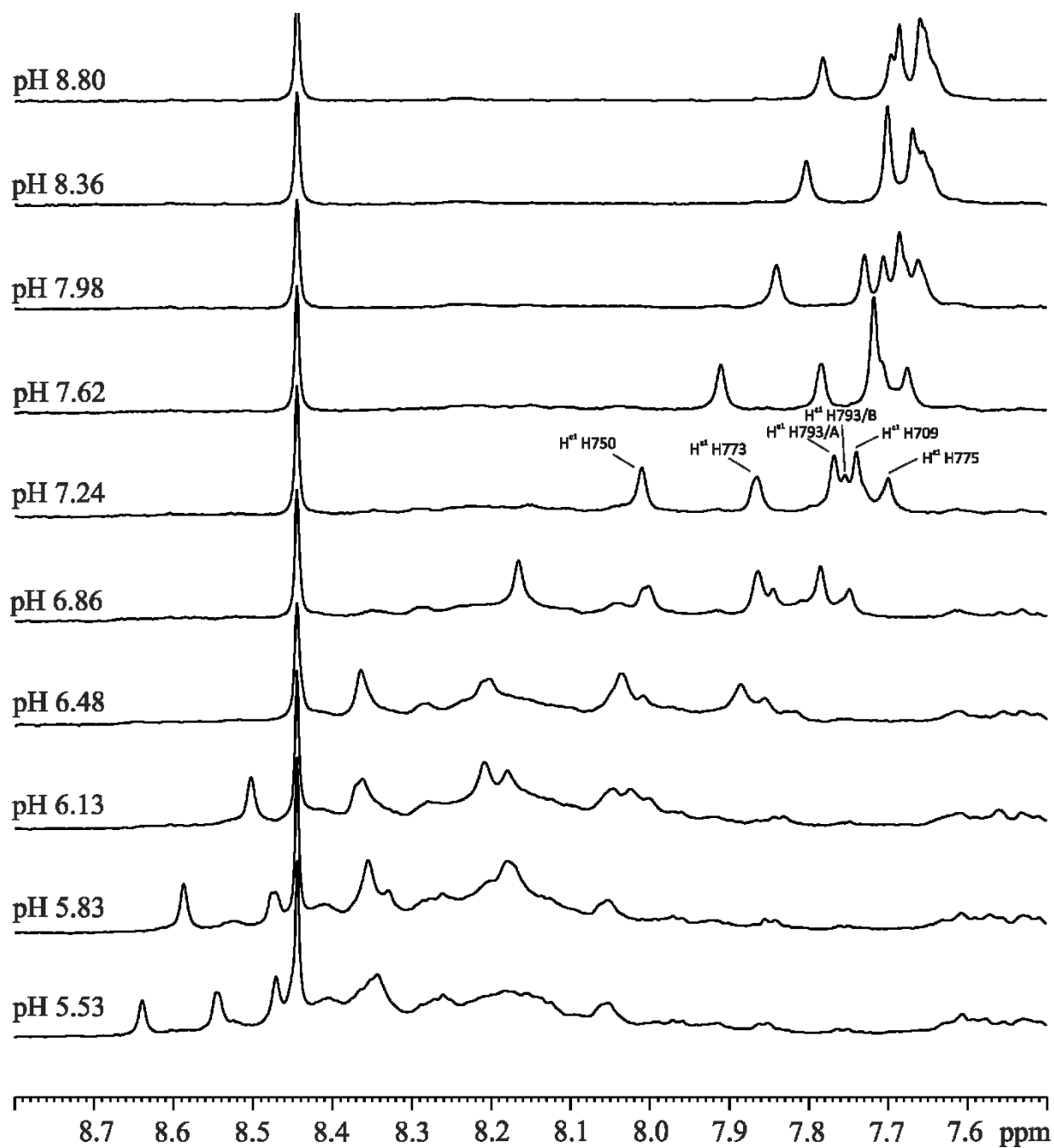
**Tabelle 23: pK-Werte für F738/B  $H^\delta$  und Y762/B  $H^\delta$**

$\delta$  chemische Verschiebung,  $\delta_0$  chemische Verschiebung der vollprotonierten Form,  $\delta_1$  chemische Verschiebung der halbprotonierten Form,  $\delta_2$  chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form.

#### 4.1.5 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste in Abwesenheit von $Ca^{2+}$ -Ionen

Im Folgenden sollten die Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(680-796) in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Ionen bestimmt werden. Dafür wurde der Probe, die bereits für die pH-Titration in Anwesenheit von Kalzium verwendet wurde, soweit EDTA zugesetzt, bis das als Indikator für Kalziumbindung dienende Signal F738/B  $H^\delta$  (vgl. 4.1.3) nicht mehr sichtbar war. Bei Eberhardt wurde bereits eine pH-Titration in Abwesenheit von Kalzium unter Hochsalzbedingungen durchgeführt. Hierbei waren keine einheitlichen Integrale für die  $H^{\epsilon 1}$ -Signale zu beobachten und nur vier der fünf  $H^{\epsilon 1}$ -Signale Histidine sichtbar (Eberhardt, 2011). Unter den neuen Bedingungen ohne Hochsalz sind insgesamt sechs Signale zu sehen (Abbildung 36). Fünf der Signale weisen ähnliche Integrale auf, während das sechste ein deutlich kleineres Integral zeigt. Die  $H^{\epsilon 1}$ -Signale wurden gemäß der Zuordnung von Eberhardt übertragen. Da in allen vorangegangenen Experimenten (4.1.1, 4.1.3, 4.1.4) H793  $H^{\epsilon 1}$  immer einen Zustand mehr als die  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der anderen Histidine und zudem das als H793/A  $H^{\epsilon 1}$  bezeichnete Signal das kleinste aller Integrale zeigte, wurde dieses sechste Signal mit dem kleinsten Integral einem zweiten Zustand B von H793  $H^{\epsilon 1}$  zugeordnet. Für alle anderen  $H^{\epsilon 1}$ -Signale kann somit in Abwesenheit von Kalziumionen in der Probe nur ein Zustand festgestellt werden. Es wurde wie in allen vorangegangenen Experimenten für die Auswertung der Populationen auf das Signal Y684  $H^\epsilon$  referenziert. In der Summe ergeben alle  $H^{\epsilon 1}$ -Signale über alle Titrationsschritte hinweg mit gewissen Abweichungen ein Integral von fünf Protonen. H750  $H^{\epsilon 1}$ , H773  $H^{\epsilon 1}$ , H709  $H^{\epsilon 1}$  und H775  $H^{\epsilon 1}$  weisen im

Verlauf der gesamten Titration ein Integral von annähernd einem Proton auf. Für 793  $H^{\epsilon 1}$  zeigen die zwei Zustände A und B ein Verhältnis von 2:1 und weisen ein Gesamtintegral auf, das etwas größer als ein Proton ist. Im sauren Bereich erschwerten nicht ausgetauschte NH-Signale die Auswertung der Integrale (Tabelle 25). In Tabelle 24 sind die chemischen Verschiebungen der Signale im Verlauf der Titration dargestellt. Im Folgenden wurden die pK-Werte aller  $H^{\epsilon 1}$ -Signale bestimmt (Abbildung 37, Tabelle 26).  $H^{\epsilon 1}$  H750 besitzt einen pK-Wert von  $6,74 \pm 0,03$ ,  $H^{\epsilon 1}$  H773 einen pK-Wert von  $6,57 \pm 0,03$ .  $H^{\epsilon 1}$  H793/A und B zeigen pK-Werte von  $6,24 \pm 0,04$  bzw.  $6,00 \pm 0,00$ .  $H^{\epsilon 1}$  H709 und  $H^{\epsilon 1}$  H775 weisen pK-Werte  $5,96 \pm 0,06$  und  $5,90 \pm 0,05$  auf. Sie liegen damit im für Histidine in Proteinen typischen Bereich (Markley, 1975). Die Signale Y762/A + B  $H^{\delta}$ , F738/B  $H^{\delta}$  (Marker für Kalziumbindung) sind ohne Kalzium in der Probe nicht vorhanden und wurden somit nicht ausgewertet.



**Abbildung 36: 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von PC2(680-796) in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Probe: Die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine shiften mit steigendem pH-Wert in Richtung Hochfeld**

Messbedingungen:  $V = 660 \mu\text{l}$ ,  $67 \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $20 \text{ mM}$  Tris,  $150 \text{ mM}$  KCl,  $40.5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $42 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  DTT,  $200 \mu\text{M}$  DSS, in  $99,9\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem  $600 \text{ MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit  $\text{LB} = 2.00$ .

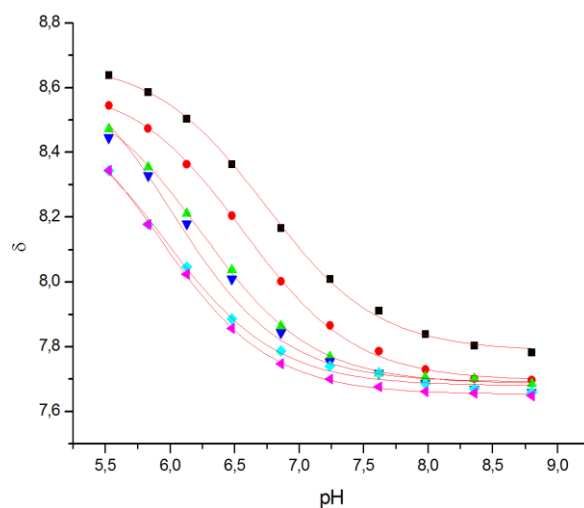
	Chemische Verschiebung $\delta$					
pH	H750 H $\epsilon^1$	H773 H $\epsilon^1$	H793/A H $\epsilon^1$	H793/B H $\epsilon^1$	H709 H $\epsilon^1$	H775 H $\epsilon^1$
5,53	8,639	8,545	8,472	8,445	8,344	8,344
5,83	8,586	8,474	8,354	8,328	8,177	8,177
6,13	8,503	8,363	8,211	8,179	8,047	8,025
6,48	8,363	8,204	8,037	8,010	7,887	7,857
6,86	8,166	8,002	7,864	7,844	7,787	7,748
7,24	8,010	7,866	7,769	7,754	7,741	7,701
7,62	7,911	7,786	7,719	7,718	7,719	7,676
7,98	7,839	7,730	7,706	7,686	7,687	7,662
8,36	7,803	7,701	7,701	7,669	7,671	7,657
8,80	7,782	7,697	7,686	7,659	7,660	7,649

**Tabelle 24: Chemische Verschiebungen der H $\epsilon^1$  - Signale der Histidine im Verlauf der pH-Titration**

Population							
pH	H750 H $\epsilon^1$	H773 H $\epsilon^1$	H793/A H $\epsilon^1$	H793/B H $\epsilon^1$	H709 H $\epsilon^1$	H775 H $\epsilon^1$	Summe
5,53	0,73	0,84	0,99	(0,29)	0,97	0,93	4,74
5,83	0,89	0,84	(0,82)	(0,34)	(1,96)		5,03
6,13	0,94	(0,91)	0,80	0,67	1,07	(0,90)	5,29
6,48	0,94	(0,93)	0,93	0,52	1,09	0,88	5,31
6,86	0,91	0,91	0,83	0,50	1,11	0,94	5,28
7,24	0,93	0,94	0,86	0,39	1,06	0,96	5,19
7,62	0,94	0,96	2,18			0,91	4,99
7,98	0,89	0,93	0,75	1,16		1,12	4,85
8,36	0,91	1,87		1,16		1,12	5,06
8,80	0,90	2,08		2,26			5,24

**Tabelle 25: Populationen der H $\epsilon^1$  - Signale der Histidine im Verlauf der pH-Titration**

Die Werte in Klammern stellen nicht eindeutig auswertbare Signale dar



**Abbildung 37: Chemische Verschiebungen  $\delta$  der Histidine gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet**

Chemische Verschiebungen der H $\epsilon^1$ -Signale der Histidine als Funktion des pH-Wertes. H $\epsilon^1$  H750 schwarz, H $\epsilon^1$  H773 rot, H $\epsilon^1$  H793/A grün, H $\epsilon^1$  H793/B blau, H $\epsilon^1$  H709 türkis, H $\epsilon^1$  H775 magenta. Messbedingungen: V = 660  $\mu$ l, 67  $\mu$ M PC2(680-796), T = 298K, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 40.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 42 mM EDTA, 1 mM DTT, 200  $\mu$ M DSS, in 99,9% D<sub>2</sub>O. Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen.

	H <sup>ε1</sup> H750	H <sup>ε1</sup> H773	H <sup>ε1</sup> H793/A	H <sup>ε1</sup> H793/B	H <sup>ε1</sup> H709	H <sup>ε1</sup> H775
<b>pK-Wert</b>	6,74 ± 0,03	6,57 ± 0,03	6,24 ± 0,04	6,00 ± 0,00	5,96 ± 0,06	5,90 ± 0,05
<b>Δδ</b>	0,89 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,93 ± 0,04	1,07 ± 0,03	0,90 ± 0,05	0,98 ± 0,06
<b>δ<sub>HA</sub></b>	8,68 ± 0,01	8,62 ± 0,02	8,62 ± 0,03	8,76 ± 0,02	8,58 ± 0,04	8,63 ± 0,05
<b>δ<sub>A-</sub></b>	7,79 ± 0,01	7,70 ± 0,00	7,69 ± 0,01	7,69 ± 0,01	7,68 ± 0,01	7,65 ± 0,01

**Tabelle 26: pK-Werte der der Histidine von PC2(680-796) in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> - Ionen**

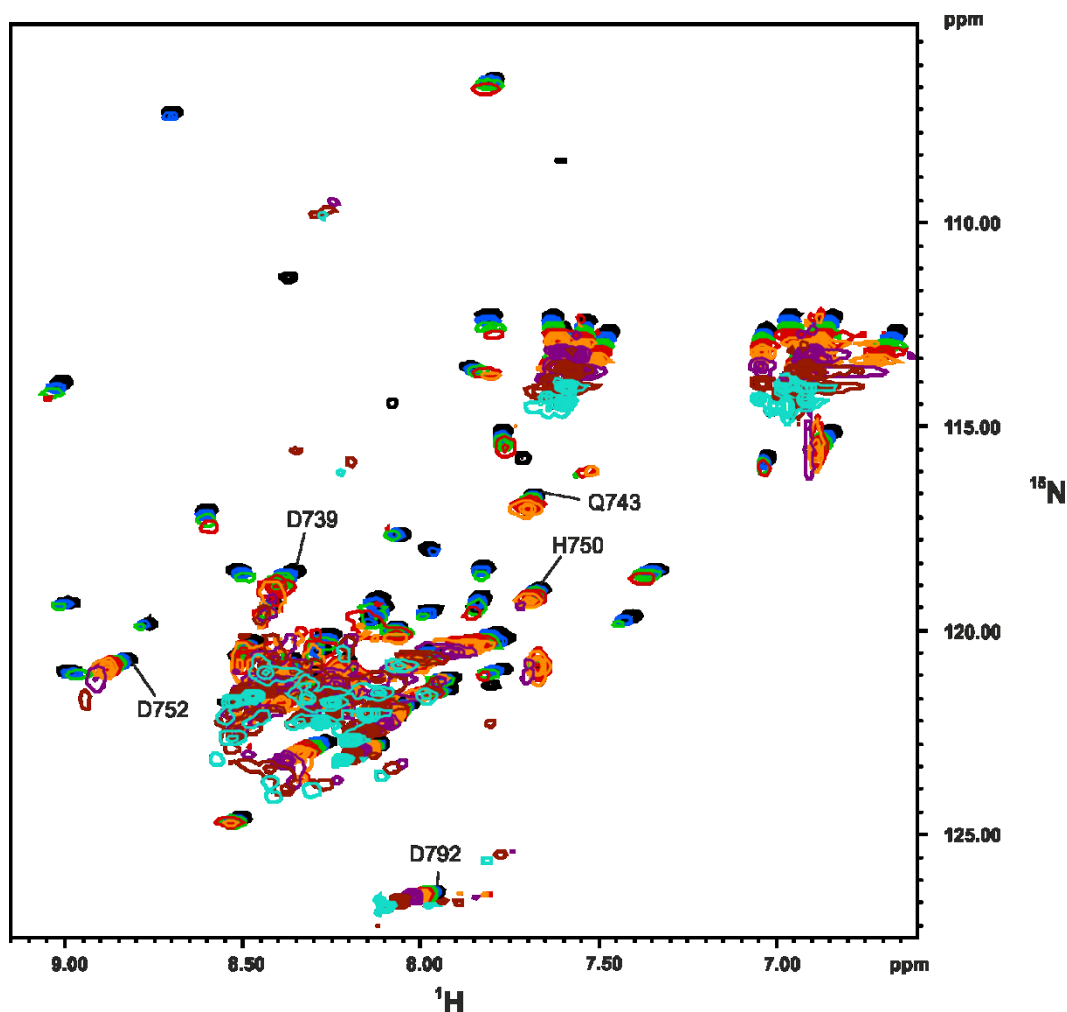
δ<sub>HA</sub> chemische Verschiebung der vollprotonierten Form, δ<sub>A-</sub> chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form, Δδ Differenz δ<sub>HA</sub> - δ<sub>A-</sub>.

#### 4.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der Titrations von PC2(680-796)

Für die Affinität von PC2(680-796) für Kalziumionen konnten drei Bindungsplätze mit den K<sub>D</sub>-Werten 10, 137 und 612 μM identifiziert werden. Sowohl die Zuordnungsexperimente, als auch die Kalziumtitration und auch die pH-Titration zeigen in Anwesenheit von Kalzium zwei verschiedene Zustände für Y762 H<sup>δ</sup>, wobei das Verhältnis von 70 : 30 bis 50 : 50 von Zustand A : B schwankt. Tendenziell ist Zustand A bei Kalziumsättigung etwas stärker populiert. Zustand B (K<sub>D</sub> ~ 10 μM, vgl. F738/B H<sup>δ</sup> im 3 BP-Modell) von Y762 H<sup>δ</sup> zeigt eine viel höhere Kalziumaffinität als Zustand A (K<sub>D</sub> = 612 μM). Aus der pH-Titration in Anwesenheit von Kalzium ist zudem die verringerte Kalziumaffinität bei niedrigerem pH zu erkennen. Zustand A von Y762 H<sup>δ</sup> ist bei niedrigem pH viel schwächer populiert. Zustand B von Y762 H<sup>δ</sup> ist aufgrund der höheren Affinität für Kalziumionen auch bei niedrigem pH bereits maximal populiert. Dies gilt auch für F738/B H<sup>δ</sup>. Die Histidine liegen in Anwesenheit von Kalzium in zwei Zuständen vor und weisen ähnlich wie Y762 zu einem großen Teil Populationsverhältnisse von ungefähr 60:40 bis 50:50 auf, wobei die Zustände A wiederum tendentiell etwas stärker populiert sind. Die chemischen Verschiebungen einiger Histidinsignale bei der Titration mit Kalzium bestätigen die ermittelten Kalziumaffinitäten der Phenylalanin- und Tyrosinsignale (vgl. 4.1.3). In Anwesenheit von Kalzium weisen die Histidine typische pK-Werte auf (Markley, 1975). Die pK-Werte von H750/A H<sup>ε1</sup> (pK 7,22) und H775/B H<sup>ε1</sup> (pK 5,75) werden mehrfach von anderen Signalen abgebildet. F738/B H<sup>δ</sup> und Y762/B H<sup>δ</sup> zeigen wie H<sup>ε1</sup> H775/A zwei pK-Werte. Zum einen einen höheren (pK-Werte 6,96 bzw. 7,13) im Bereich des pK-Werts von H750/B. Zum anderen einen jeweils einen sehr niedrigen pK-Wert (4,85 bzw. 5,37), der im Bereich des pK-Werts von H<sup>ε1</sup> H775/B liegt. F759/A H<sup>δ</sup> und Y762/A H<sup>δ</sup> weisen ähnliche pK-Werte wie H<sup>ε1</sup> H775/B auf (pK-Werte 5,71, 5,83 bzw. 5,75). In Abwesenheit von Kalzium konnten im Verlauf pH-Titration für die H<sup>ε1</sup>-Signale von H750, H773, H709 und H775 nur ein Zustand mit einem Integral von ca. einem Proton festgestellt werden. Das H<sup>ε1</sup>-Signal von H793 ist wahrscheinlich in zwei Zuständen vorhanden. Die pK-Werte liegen im normalen Bereich für Histidine in Proteinen (Markley, 1975). Die Markersignale für die Kalziumbindung Y762/A + B H<sup>δ</sup>, F738/B H<sup>δ</sup> sind ohne Kalzium in der Probe nicht vorhanden.

## 4.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck

Im Folgenden wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung an  $^{15}\text{N}$ -gelabeltem PC2(717-792) unter Hochdruck bei 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in der Probe untersucht. Die Spektren wurden entsprechend der Zuordnung aus 4.3.2 zugeordnet. Es wurden bei verschiedenen Druckstufen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren aufgenommen (Abbildung 38). Der Druck wurde in 10 MPa-Schritten bis zu einem Maximaldruck von 250 MPa erhöht. Ab 200 MPa wurde zweimal um 20 MPa erhöht. Bei jedem Schritt wurden jeweils ein  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum und ein  $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum aufgenommen. Zum Schluss der Messreihe wurde nach dem Messpunkt bei 250 MPa ein Kontrollspektrum bei 1 MPa aufgenommen. Sowohl die 1D- (Abbildung 41) als auch die 2D- Spektren (nicht abgebildet) zeigen an, dass es sich bei den druckinduzierten Veränderungen um einen vollständig reversiblen Prozess handelt.



**Abbildung 38: Overlay-Darstellung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) bei verschiedenen Druckschritten**  
Gezeigt werden die Druckschritte 1 MPa (schwarz), 20 MPa (blau), 40 MPa (grün), 60 MPa (rot), 80 MPa (orange), 120 MPa (lila), 180 MPa (braun), 250 MPa (türkis). Messbedingungen:  $V=300\ \mu\text{l}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ .

Der  $\text{CH}_3$ -Bereich von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) bei  $1.00\text{-}0.04\ \text{ppm}$  im  $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum wurde integriert und die Integrale über das Trissignal kompressionskorrigiert. Das Integral des  $\text{CH}_3$ -Bereichs bleibt im Verlauf der Druckreihe konstant (Tabelle 27). Daraus ist ersichtlich, dass während der Messreihe kein

Protein verloren geht oder als Polymer unsichtbar wird. Das Fehlen von scharfen Linien bei Tetrapeptidwerten zeigt außerdem, dass  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) nicht als Random-Coil-Peptid vorliegt.

MPa	Integral 1.00-0.04 ppm (kompressionskorrigiert)
1	128703616
40	125215761
80	125218500
120	126106915
160	126688047
200	127607435
250	125122839

**Tabelle 27: Das Integral des  $\text{CH}_3$ -Bereichs von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) bleibt im Verlauf der Druckreihe konstant**

Die Kompressionskorrektur erfolgte über das Trissignal (vgl. 3.5.7.2 und Abbildung 42). Messbedingungen:  $V=300\ \mu\text{l}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ .

#### 4.2.1 Aggregationszustand und relative hydrodynamische Radii von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck

Um den Aggregationszustand von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) zu bestimmen, wurden bei verschiedenen Druckstufen Diffusionmessungen (vgl. 3.5.5) durchgeführt. Die scheinbaren Molekülmassen und relativen hydrodynamischen Radii sind in Tabelle 28 aufgeführt. Abbildung 39 zeigt beispielhaft die Fits für die abfallende Signalintensität  $I/I_{\text{ref}}$  als Funktion der relativen Gradientenstärke  $G$  bei 1 und 250 MPa. Abbildung 40 zeigt die Reduktion der scheinbaren Molekülmassen von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) bei ansteigendem Druck.  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) weist bei 1 MPa eine scheinbare Molekülmasse von  $16725 \pm 998\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  auf, was in etwa der Molekülmasse eines Dimers entspricht. Die scheinbare Molekülmasse nimmt mit steigenden Druck schrittweise ab. Ab einem Druck von 60 MPa scheint  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) weitestgehend als Monomer vorzuliegen.

Druck (MPa)	$R_h^a$	$M_{\text{exp}}^b$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_{\text{calc}}^c$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
1	$1,522 \pm 0,048$	$16725 \pm 998$	9,126
10	$1,471 \pm 0,048$	$15072 \pm 958$	9,126
40	$1,426 \pm 0,048$	$13759 \pm 923$	9,126
50	$1,390 \pm 0,046$	$12726 \pm 818$	9,126
60	$1,331 \pm 0,037$	$11182 \pm 549$	9,126
70	$1,367 \pm 0,035$	$12100 \pm 519$	9,126
80	$1,303 \pm 0,054$	$10493 \pm 947$	9,126
90	$1,355 \pm 0,053$	$11797 \pm 967$	9,126
100	$1,303 \pm 0,054$	$10493 \pm 939$	9,126
110	$1,331 \pm 0,063$	$11182 \pm 1210$	9,126
120	$1,298 \pm 0,033$	$10354 \pm 421$	9,126
130	$1,331 \pm 0,047$	$11182 \pm 794$	9,126
140	$1,308 \pm 0,037$	$10602 \pm 531$	9,126
150	$1,280 \pm 0,044$	$9945 \pm 694$	9,126
160	$1,344 \pm 0,047$	$11498 \pm 797$	9,126
170	$1,288 \pm 0,044$	$10118 \pm 689$	9,126
180	$1,332 \pm 0,054$	$11204 \pm 978$	9,126

190	$1,309 \pm 0,044$	$10632 \pm 714$	9,126
200	$1,309 \pm 0,035$	$10632 \pm 490$	9,126
250	$1,324 \pm 0,056$	$11010 \pm 1020$	9,126

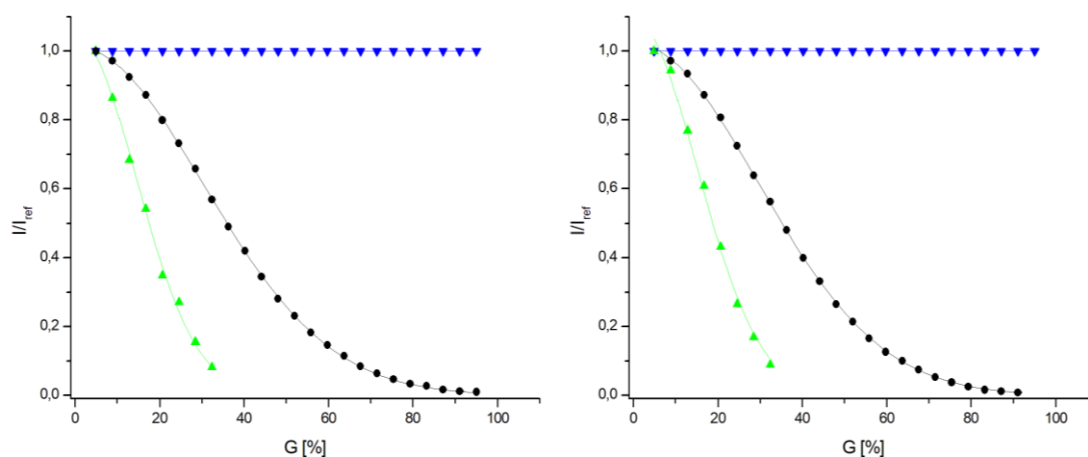
**Tabelle 28: Scheinbare Molekülmassen und relative hydrodynamische Radii von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Druck in Anwesenheit von 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in der Probe**

Messbedingungen:  $V=300\ \mu\text{l}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ .

<sup>a</sup> Berechnete relative hydrodynamische Radii von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792). Es wurde der von Wierschem für DSS experimentell ermittelte hydrodynamische Radius von  $0,346 \pm 0,004\ \text{nm}$  zur Berechnung des relativen hydrodynamischen Radius von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) verwendet (Wierschem, 2013)

<sup>b</sup> experimentell ermittelte scheinbare Molekülmasse von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) mit DSS ( $196,34\ \text{g}^*\text{mol}^{-1}$ ) als Referenz in der Probe

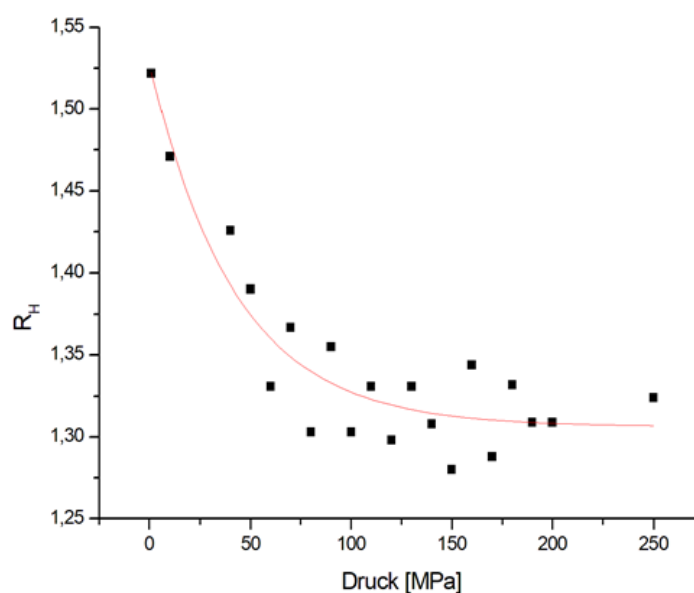
<sup>c</sup> auf Basis der Sequenz berechnete Molekülmasse des Monomers von PC2(717-792) einschließlich zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen



**Abbildung 39: Diffusionsmessungen von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) bei 1 MPa (links) und 250 MPa (rechts)**

Gezeigt wird der Signalabfall von PAA (blau), PC2(717-792) (schwarz), und DSS (grün). Graph von  $I/I_{\text{ref}}$  als Funktion der relativen Gradientenstärke G, wobei I die Signalintensität beim Gradienten G und  $I_{\text{ref}}$  die Signalintensität beim niedrigsten Gradienten angibt. Als Referenz wurde DSS benutzt. Polyacrylamid ( $90\%\text{H}_2\text{O}$ ,  $10\%\text{D}_2\text{O}$ ) wurde im Vorfeld der Messungen benutzt, um die Stabilität des Gradientensystems zu überprüfen. Messbedingungen:  $V=300\ \mu\text{l}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 8192, F1: 24); NS 46. Datenprozessierung: SI (F2: 8192, F1: 24); EM-Filter mit LB = 2.





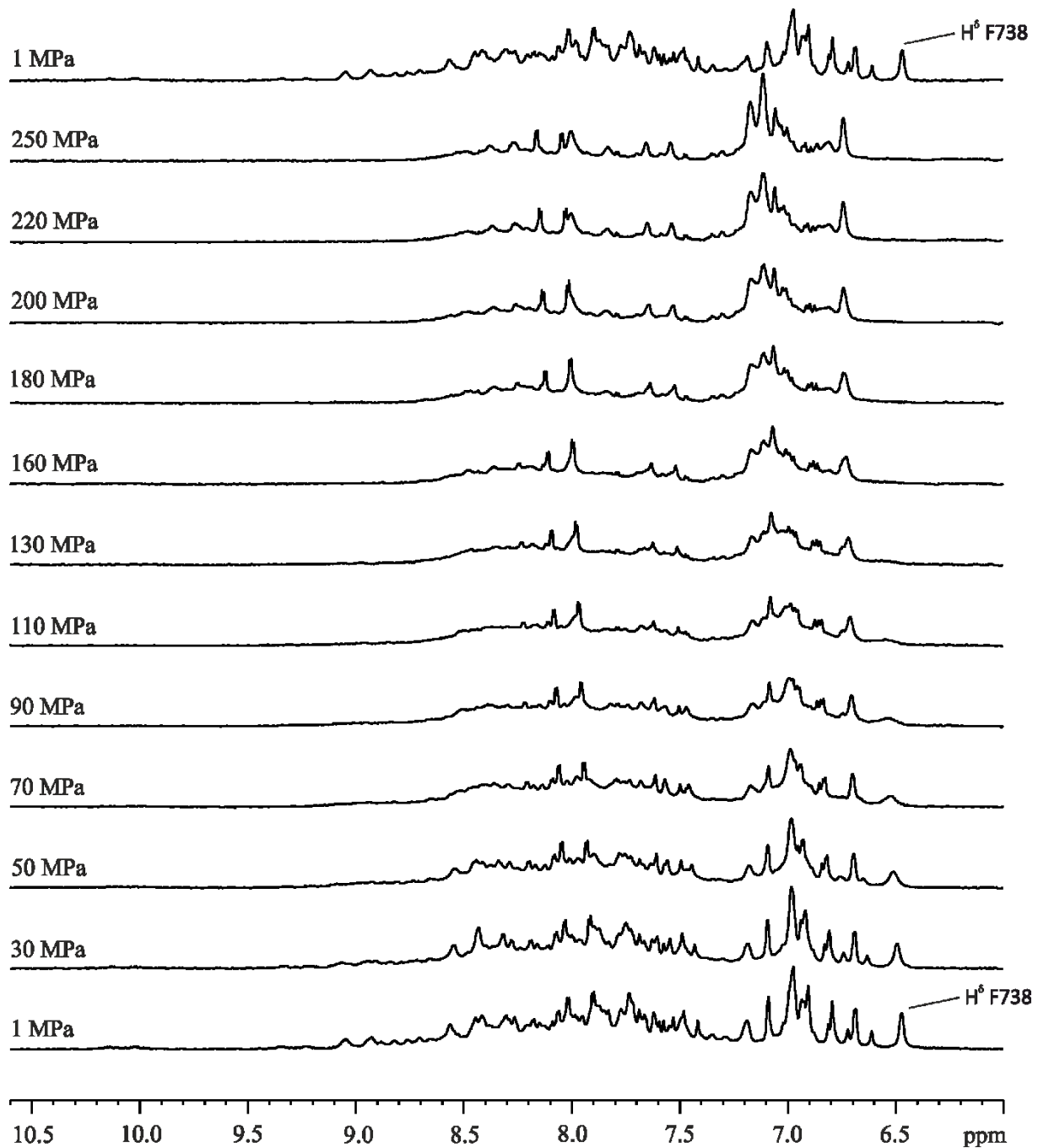
**Abbildung 40: Reduktion der beobachteten relativen hydrodynamischen Radii  $R_H$  von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) bei ansteigendem Druck**

Messbedingungen:  $V=300\ \mu\text{l}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ .

#### 4.2.2 Kalziumfreisetzung an $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck

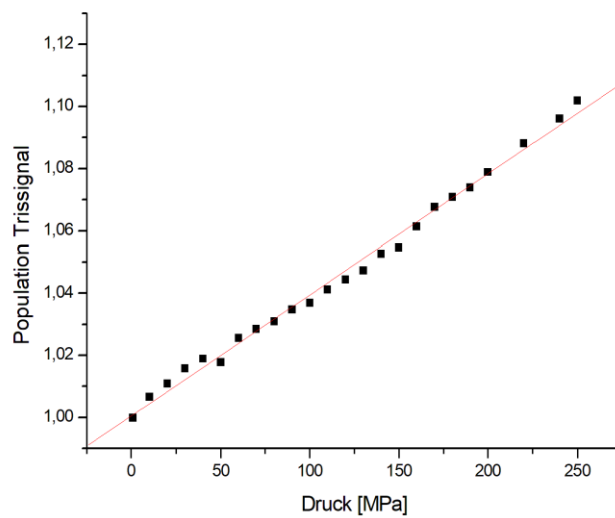
In den  $1\text{D-}^1\text{H}$ -NOESY-Spektren in Abbildung 41 ist das als Marker für die Kalziumbindung bekannte Signal F738  $\text{H}^\delta$  zu sehen (vgl. 4.1.3). Bei Referenzierung auf Y762  $\text{H}^\epsilon$  bei  $6,685\ \text{ppm}$  ergibt sich bei  $1\ \text{MPa}$  ein Integral von  $2,12$  Protonen und somit eine Population von  $1,06$  für F738  $\text{H}^\delta$ . Im Rahmen des Fehlers kann von einer vollständigen Besetzung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ausgegangen werden. Für die Auswertung der Signalvolumina wurde eine Volumenkorrektur über das Tris-Signal durchgeführt. Da aufgrund des steigenden Drucks und der daraus resultierenden Kompression der Flüssigkeit die Konzentration von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) in der Druckzelle ansteigt, wird für die korrekte Auswertung der Signalvolumina im Verlauf der Druckreihe dieser Effekt herausgerechnet. Die Anwendung hoher Drücke auf Proteine führt zu lokalen und globalen Konformationsänderungen, die sich in den veränderten chemischen Verschiebungen und Signalvolumina widerspiegeln. Das im Puffer enthaltene Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) besitzt aufgrund seiner geringen Größe keine dreidimensionale Struktur und vollzieht somit keine Konformationsänderungen aufgrund des angewandten Drucks. Alle Änderungen des Signalvolumens des Trissignals sind daher auf die Konzentrationsänderung in der Probe durch den Kompressionseffekt zurückzuführen. Das Integral des Trissignals nimmt mit steigendem Druck nahezu linear zu (Abbildung 42). Um den Effekt der Kompression auf die Proteinsignale herauszurechnen, werden die Signalvolumina von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) um den Faktor der Volumenzunahme des Trissignals korrigiert. In den  $1\text{D-}^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) kann im Verlauf der Druckreihe bei steigendem Druck für das Signal F738  $\text{H}^\delta$  eine Änderung der chemischen Verschiebung, lineare Abnahme des Integrals und eine Verbreiterung des Signals festgestellt werden. Wie bereits erwähnt, wurde F738  $\text{H}^\delta$  in vorangegangenen Experimenten als Markersignal für die Kalziumbindung in PC2 identifiziert (Eberhardt, 2011; Schumann et al., 2009a). F738  $\text{H}^\delta$  verhält sich in Bezug auf das Integral mit steigendem Druck genau entgegengesetzt zu einer Titration mit Kalziumionen, bei der das Integral bei Kalziumzugabe bis zu

einem Sättigungswert zunimmt (vgl. 4.1.3). Im Fall der Druckanwendung nimmt das Integral von F738 H<sup>δ</sup> ausgehend von einer Vollsättigung der EF-Hände mit Kalziumionen bei 1 MPa mit steigendem Druck linear ab (Abbildung 44, Abbildung 41). Ab einem Druck von 160 MPa ist das Signal im Spektrum nicht mehr sichtbar. Zusätzlich zeigt Linienbreite des Signals einen sigmoidalen Verlauf und nimmt bis zu einem Sättigungswert zu (Abbildung 45, Abbildung 41). Die random-coil korrigierte chemische Verschiebung von F738 H<sup>δ</sup> im 1D-NOESY-Spektrum wurde gegen den Druck aufgetragen und mit Formel 21 gefittet (Abbildung 43). Der Fit ergibt eine ähnliche Kurve wie der Fit der random-coil korrigierten kombinierten chemischen Verschiebung von F738 H<sup>δ</sup> aus den HSQC-Spektren (s. 4.2.3). Wie bereits beschrieben handelt es sich bei den druckinduzierten Veränderungen um einen komplett reversiblen Prozess. Ebenso ist das Signal F738 H<sup>δ</sup> im Kontrollspektrum bei 1 MPa am Ende der Druckreihe wieder komplett vorhanden.



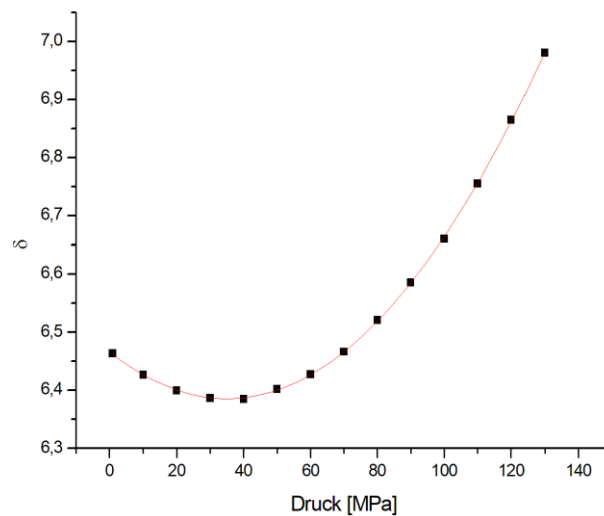
**Abbildung 41: Kalziumfreisetzung an  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck**

Anhand des mit steigendem Druck abnehmenden Integrals des Markersignals für die Kalziumbindung,  $\text{H}^\delta \text{F738}$ , kann die Kalziumfreisetzung verfolgt werden. Bei einem Druck von 160 MPa ist das Signal im Spektrum nicht mehr sichtbar. Messbedingungen:  $V=300\ \mu\text{l}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD 65635; NS 128. Datenprozessierung: SI 131072; EM-Filter mit  $\text{LB} = 3$ .



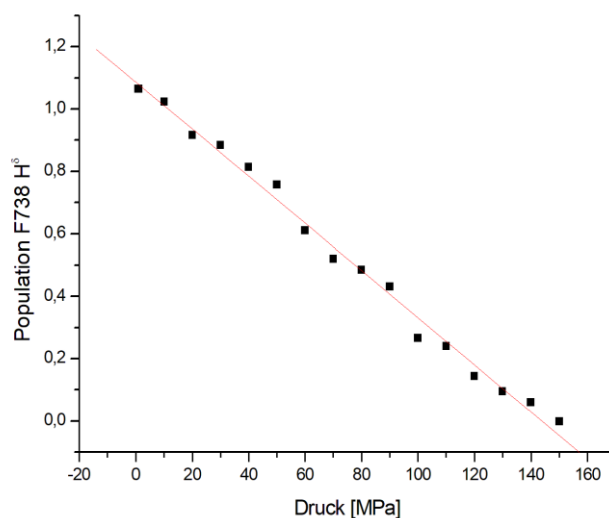
**Abbildung 42: Lineare Volumenzunahme des Trissignals durch die Konzentrationserhöhung resultierend aus der Kompression der Pufferflüssigkeit**

Der Startwert wurde auf 1 normiert. Messbedingungen: V=300  $\mu$ l, 400  $\mu$ M PC2(717-792), T = 298K, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 25  $\mu$ M AEBSF, 50  $\mu$ M DSS, 5% D<sub>2</sub>O.



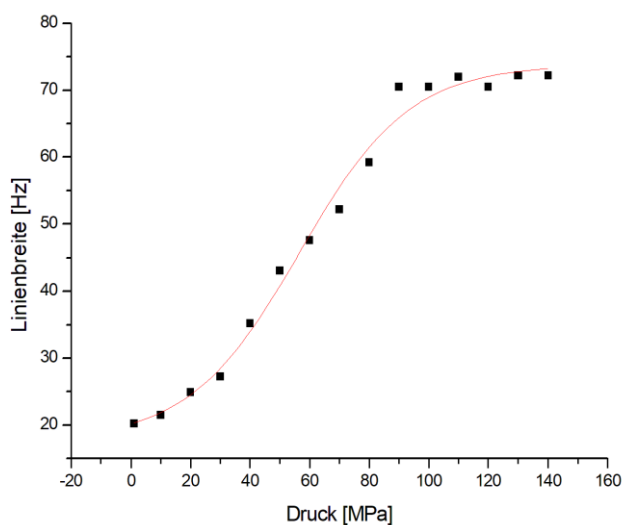
**Abbildung 43: Random-coil korrigierte chemische Verschiebung  $\delta$  von F738 H<sup>6</sup> bei steigendem Druck im 1D-NOESY-Spektrum. F738 H<sup>6</sup> dient als Markersignal für die Kalziumbindung**

Fit mit Formel 21, B<sub>2</sub>-Wert 0,00007  $\pm$  3,7055E-7. Messbedingungen: V=300  $\mu$ l, 400  $\mu$ M PC2(717-792), T = 298K, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 25  $\mu$ M AEBSF, 50  $\mu$ M DSS, 5% D<sub>2</sub>O



**Abbildung 44: Lineare Abnahme des Integrals von F738 H $\delta$  bei steigendem Druck. F738 H $\delta$  dient als Markersignal für die Kalziumbindung**

Startwert bei 1 MPa ist eine Population von 1,06 für F738 H $\delta$  bei Referenzierung auf das Y762 H $\epsilon$ -Signal. Messbedingungen: V=300  $\mu$ l, 400  $\mu$ M PC2(717-792), T = 298K, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 25  $\mu$ M AEBSF, 50  $\mu$ M DSS, 5% D<sub>2</sub>O.



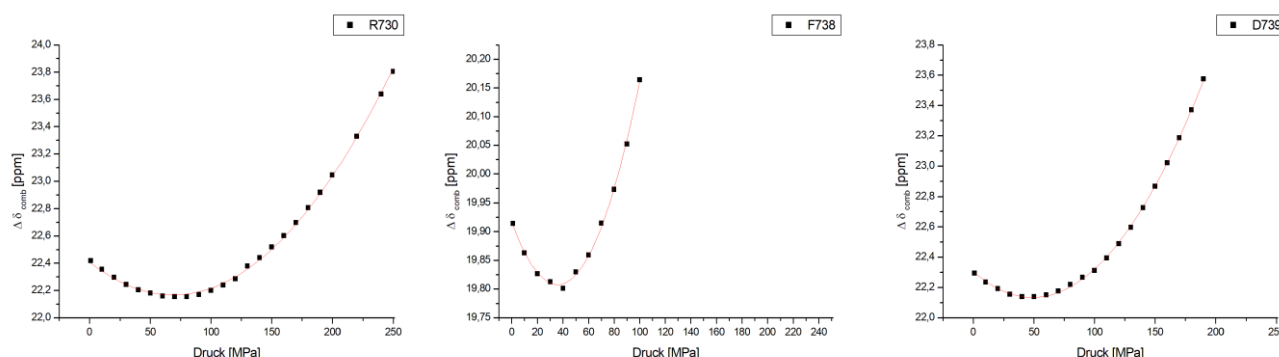
**Abbildung 45: Linienbreite von F738 H $\delta$  bei steigendem Druck. F738 H $\delta$  dient als Markersignal für die Kalziumbindung**

Messbedingungen: V=300  $\mu$ l, 400  $\mu$ M PC2(717-792), T = 298K, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 25  $\mu$ M AEBSF, 50  $\mu$ M DSS, 5% D<sub>2</sub>O.

#### 4.2.3 Chemische Verschiebungsänderungen in den $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren bei $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck

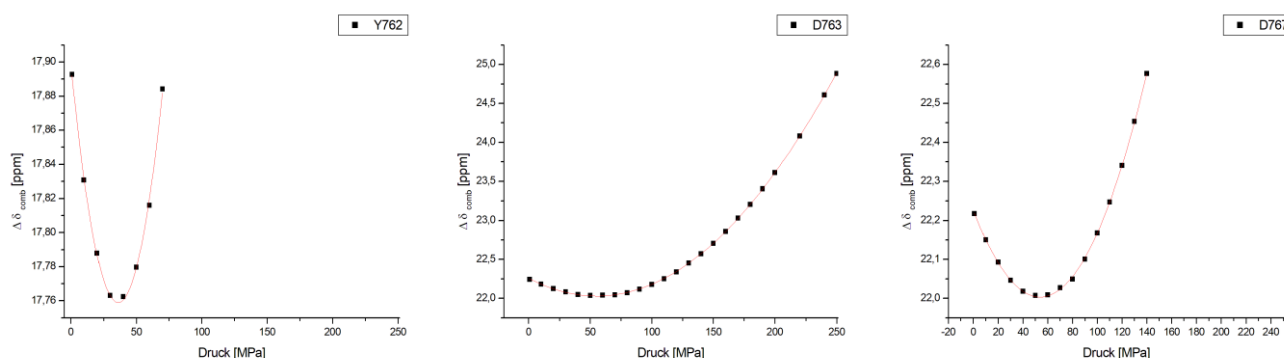
Im Folgenden soll das Verhalten von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter der Anwendung von Hochdruck anhand der beobachteten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale in den  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren beschrieben werden. Dazu wurden die random-coil korrigierten kombinierten chemischen

Verschiebungsänderungen gegen den Druck (MPa) geplottet und mit Formel 21 gefittet (vgl. 3.5.7). Abbildung 46 und Abbildung 47 zeigen exemplarisch die Fits der Aminosäuren R730, F738 und D739 aus der atypischen EF-Hand 1 (EF1) und der Aminosäuren Y762, D763 und D767 aus der kanonischen EF-Hand 2 (EF2), wobei Y762 eine Aminosäure vor EF2 liegt. Die Beträge der so erhaltenen Druckkoeffizienten 2. Ordnung  $B_2^*$  sind in Abbildung 48 dargestellt. Das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  ist durch die rote Linie dargestellt. Die größten Beträge für die Druckkoeffizienten  $B_2^*$  wurden für die Bereiche der beiden EF-Hände (AS 727-739 bzw. AS 763-774) erhalten. Die Druckkoeffizienten  $B_2^*$  der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen wurden in Abbildung 49 auf die 3D-Struktur geplottet. Die Druckkoeffizienten  $B_2^*$  oberhalb des Signifikanzniveaus  $\sigma_0^{\text{kor}}$  sind in rot dargestellt. Die Größe der Druckkoeffizienten hängt von der Stärke der Konformationsänderungen im Protein ab und kann daher als semi-quantitatives Maß für diese Änderungen benutzt werden (Kalbitzer et al., 2013). Auf die Auswertung der  $B_1$ -Werte wurde aufgrund des großen Fehlers verzichtet.



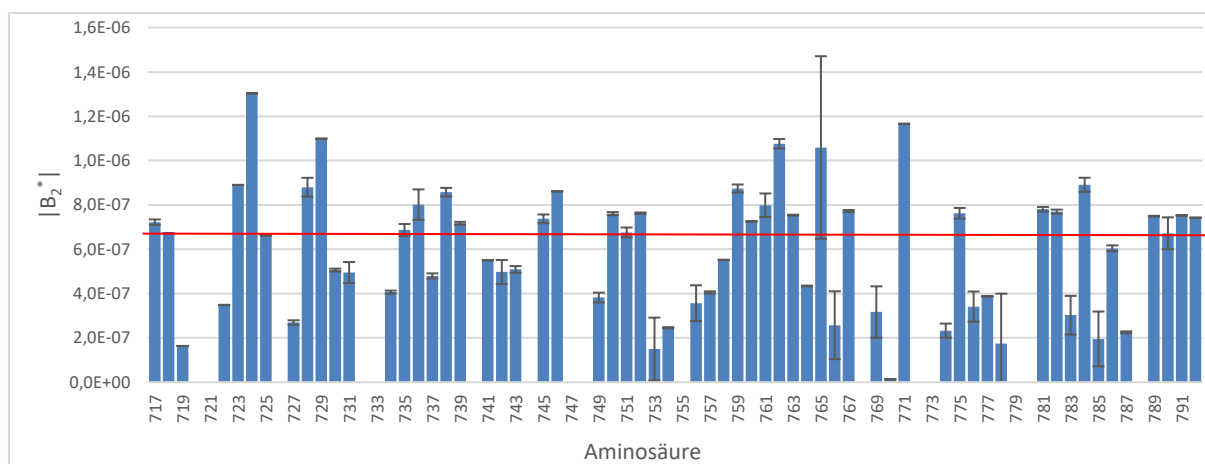
**Abbildung 46: Kombinierte chemische Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta_{\text{comb}}$  der Aminosäuren R730, F738 und D739 aus EF1 gegen den Druck aufgetragen und mit Formel 21 gefittet**

Messbedingungen: V=300  $\mu$ l, 400  $\mu$ M PC2(717-792), T = 298K, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 25  $\mu$ M AEBSF, 50  $\mu$ M DSS, 5% D<sub>2</sub>O.



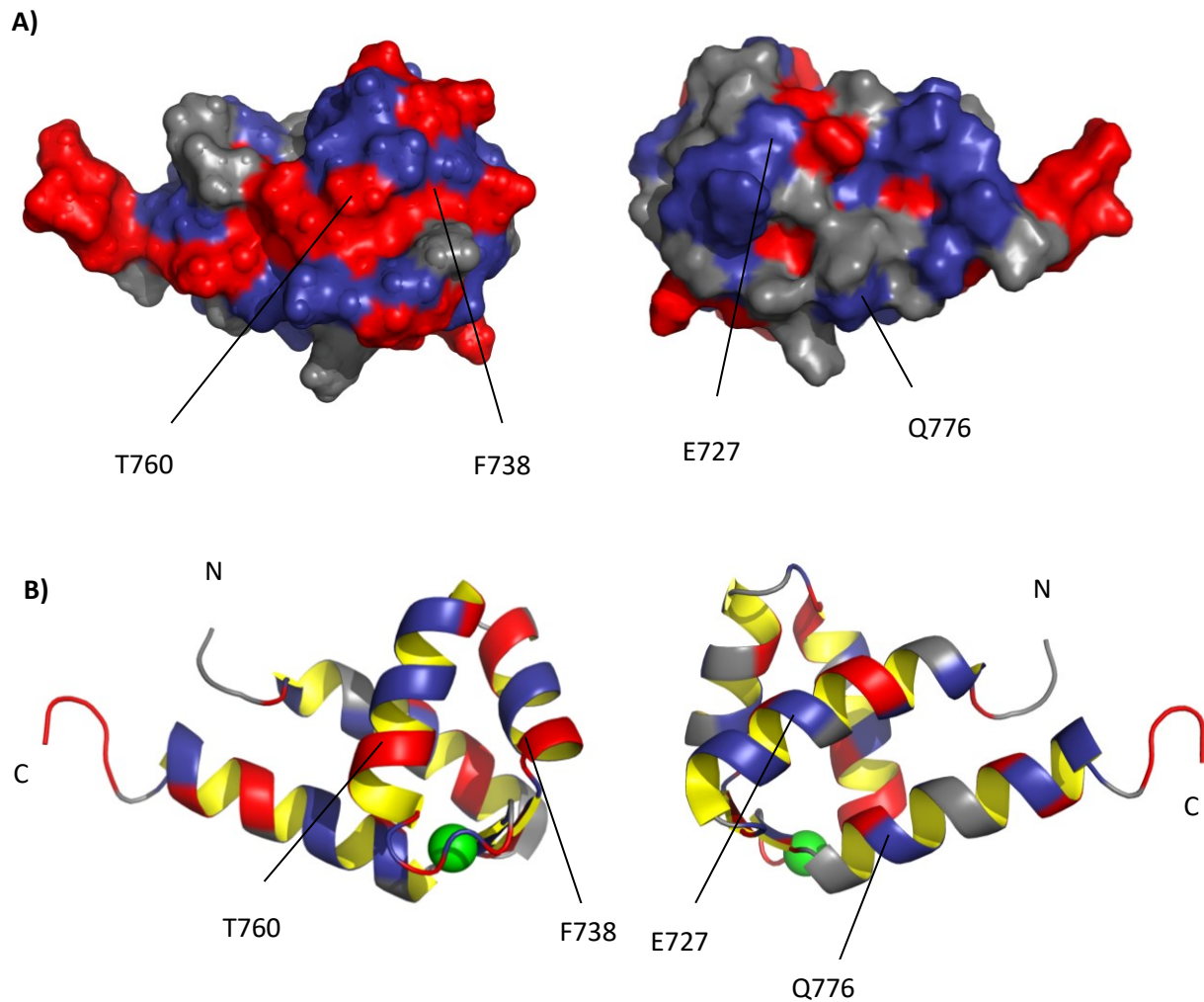
**Abbildung 47. Kombinierte chemische Verschiebungsänderungen  $\Delta\delta_{\text{comb}}$  der Aminosäuren Y762 (eine Aminosäure vor EF2), D763 und D767 aus EF2 gegen den Druck aufgetragen und mit Formel 21 gefittet**

Messbedingungen: V=300  $\mu$ l, 400  $\mu$ M PC2(717-792), T = 298K, pH 7.5, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 25  $\mu$ M AEBSF, 50  $\mu$ M DSS, 5% D<sub>2</sub>O.



**Abbildung 48: Betrag der Druckkoeffizienten  $B_2^*$  der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) im HSQC-Spektrum**

Das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}r$  ist durch die rote Linie dargestellt ( $\sigma_0^{\text{kor}}r = 6,71\text{E-}07$ ). Messbedingungen:  $V=300\ \mu\text{l}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 8. Datenprozessierung für Auswertung der chemischen Verschiebungen: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).



**Abbildung 49: Druckkoeffizienten  $B_2^*$  der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Aminosäuren von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) geplottet auf die 3D-Struktur (PDB: 2Y4Q)**

(A) Oberflächendarstellung: Gezeigt werden die Druckkoeffizienten  $B_2^*$  der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen oberhalb von  $\sigma_0^{\text{korrt}}$  in rot, unterhalb von  $\sigma_0^{\text{korrt}}$  in blau. Graue Bereiche enthalten keine Information aus den NMR-Messungen. (B) Cartoondarstellung von A. Das Kalziumion in der kanonischen EF-Hand ist in grün eingezeichnet.

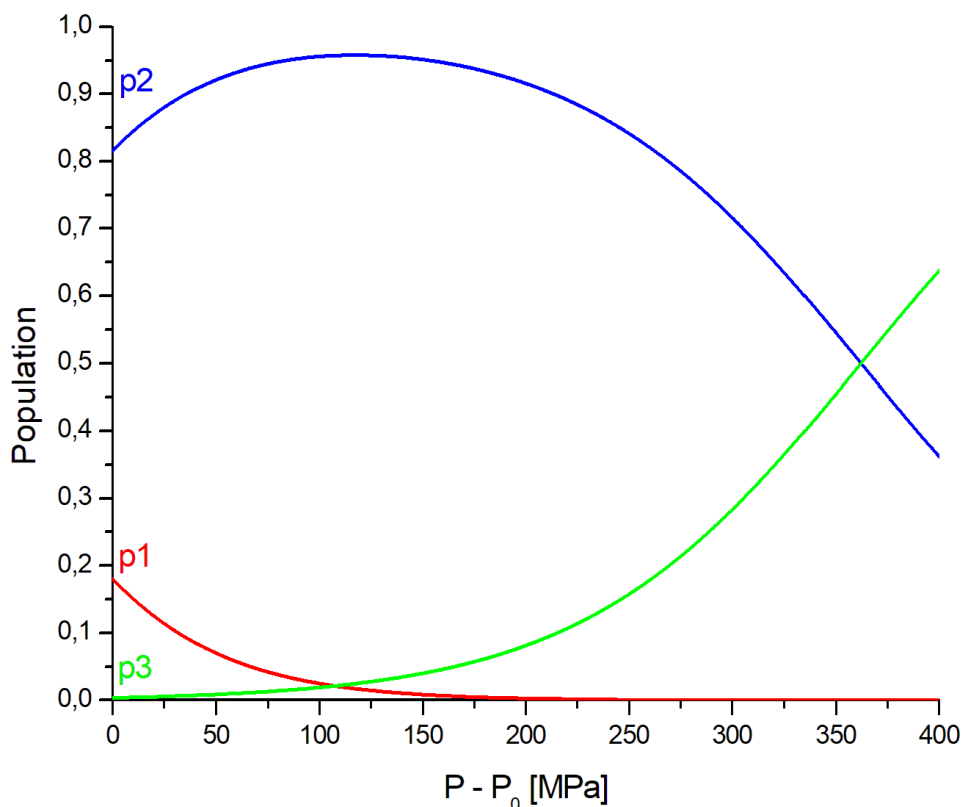


#### 4.2.4 Unterschiede der freien Enthalpien und partiellen Volumina

Die Populationen verschiedener Konformere des Proteins im schnellen Austausch werden im thermischen Gleichgewicht von der Differenz der freien Enthalpien  $\Delta G_{1i}^0$  bestimmt. Das Auftreten einer Vielzahl von biphasischen Kurven (Abbildung 46, Abbildung 47) deutet darauf hin, dass  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) in mindestens 3 Zuständen vorliegt, d.h. es existieren mindestens zwei Übergänge. Es wurden 24 informationstragende Kurven ausgewählt. Im Folgenden wurden mit Formel 22  $\Delta G^0$  und  $\Delta V^0$ , die freien Enthalpien bei Normaldruck bzw. die partiellen molaren Volumen bei Normaldruck, für die zwei Übergänge im 3-Zustandsmodell errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 29 dargestellt. Es ergibt sich für den Übergang von Zustand 1 zu 2 ein  $\Delta G_{12}^0$  von  $-3735 \pm 42$  J/mol und ein  $\Delta V_{12}^0$  von  $-53 \pm 18,28$  ml/mol. Für den Übergang von Zustand 1 zu 3 ergibt sich ein  $\Delta G_{13}^0$  von  $9663 \pm 25$  J/mol und ein  $\Delta V_{13}^0$  von  $-89,83 \pm 0,56$  ml/mol. Aus der Differenz von  $\Delta G_{13}^0$  und  $\Delta G_{12}^0$  bzw.  $\Delta V_{13}^0$  und  $\Delta V_{12}^0$  erhält man für den Übergang von Zustand 2 zu 3 ein  $\Delta G_{23}^0$  von  $13398 \pm 67$  J/mol und ein  $\Delta V_{23}^0$  von  $36,83 \pm 18,84$  ml/mol. Die freien Enthalpien  $\Delta G^0$  bestimmen die Populationsverhältnisse der Zustände von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) und zeigen damit die relativen Konzentrationen der einzelnen Zustände des Proteins bei Normaldruck an. Aufgrund des Prinzips des kleinsten Zwangs verschiebt sich bei Druckanwendung die Population immer in Richtung des Zustands mit dem kleineren partiellen molaren Volumen. Mit den Parametern aus Tabelle 29 und Formel 23 wurden die relativen Populationen der drei konformationellen Zustände von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) als Funktion des Drucks berechnet und in Abbildung 50 dargestellt. Bei Normaldruck ist demnach Zustand 2 am stärksten populierte, weit schwächer Zustand 1 und am schwächsten Zustand 3. Mit steigendem Druck nimmt im Modell die Population von Zustand 3 zu und ist ab ca. 370 MPa stärker populierte als Zustand 2. Zustand 1 nimmt mit steigendem Druck kontinuierlich ab und verschwindet irgendwann fast ganz.

$\Delta G_{12}^0$	$-3735 \pm 42$ J/mol
$\Delta V_{12}^0$	$-53 \pm 18,28$ ml/mol
$\Delta G_{13}^0$	$9663 \pm 25$ J/mol
$\Delta V_{13}^0$	$-89,83 \pm 0,56$ ml/mol
$\Delta G_{23}^0$	$13398 \pm 67$ J/mol
$\Delta V_{23}^0$	$36,83 \pm 18,84$ ml/mol

Tabelle 29: Ergebnisse des 3-Zustandsmodells im schnellen Austausch

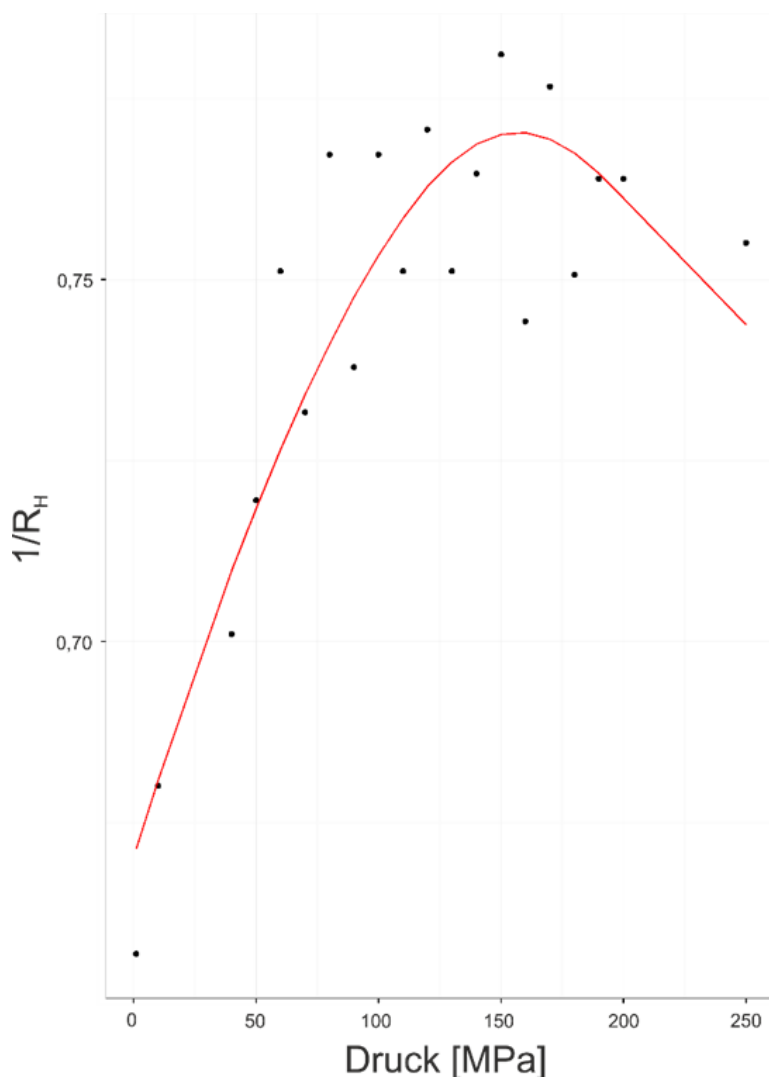


**Abbildung 50: Konformationelle Änderungen von <sup>15</sup>N-PC2(717-792) unter Druckanwendung**

Die relativen Populationen der drei konformationellen Zustände von <sup>15</sup>N-PC2(717-792) wurden mit den Parametern aus Tabelle 29 als Funktion des Drucks berechnet. Zustand 1 in rot, Zustand 2 in blau und Zustand 3 in grün.

#### 4.2.5 Relative Diffusionskonstanten der drei Zustände von <sup>15</sup>N-PC2(717-792)

Die mit Formel 22 berechneten Werte im 3-Zustandsmodell im schnellen Austausch für  $\Delta G^0$ - und  $\Delta V^0$  aus Tabelle 29 wurden in Formel 25 eingesetzt und damit die während der Druckreihe gemessenen relativen Diffusionskonstanten  $1/R_H$  (vgl. Tabelle 28 für Werte  $R_H$ ) im 3-Zustandsmodell gefittet (Abbildung 51). Dadurch wurden die relativen Diffusionskonstanten der drei Zustände von <sup>15</sup>N-PC2(717-792) bei Normaldruck erhalten. Mit Formel 25 wurden hieraus die scheinbaren Molekülmassen der drei Zustände von <sup>15</sup>N-PC2(717-792) bei Normaldruck berechnet (Tabelle 30). Zustand 1 zeigt mit  $1727102 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  eine viel zu hohe scheinbare Molekülmasse mit sehr großem Fehler an. Der Wert wäre die 189-fache Molekülmasse eines Monomers und ist damit nicht realistisch. Zustand 2 weist eine scheinbare Molekülmasse von  $7717 \pm 571 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  auf und befindet sich damit etwas unter dem Wert für ein Monomer von  $9,126 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Zustand 3 von <sup>15</sup>N-PC2(717-792) zeigt eine scheinbare Molekülmasse von  $12182 \pm 542 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  und liegt etwas über dem Wert für ein Monomer <sup>15</sup>N-PC2(717-792).



**Abbildung 51: Relative Diffusionskonstanten  $1/R_H$  von  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$  gegen den Druck aufgetragen und mit 3-Zustandsmodell gefittet**

Fit der relativen Diffusionskonstanten (Kehrwerte der relativen hydrodynamischen Radii  $1/R_H$ ) mit Formel 25 und  $\Delta G^0$ - bzw.  $\Delta V^0$ -Werten aus Tabelle 29. Messbedingungen:  $V=300\ \mu\text{l}$ ,  $400\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ .

$^{15}\text{N-PC2(717-792)}$	$1/R_H^a$	$R_h^b$	$M^c [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$	$M_{\text{calc}}^d [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]$
Zustand 1	$0.14 \pm 0.11$	$7.14 \pm 5.61$	$1727102 \pm 4076945$	9,126
Zustand 2	$0.85 \pm 0.02$	$1.18 \pm 0.03$	$7717 \pm 571$	9,126
Zustand 3	$0.73 \pm 0.01$	$1.37 \pm 0.02$	$12182 \pm 542$	9,126

**Tabelle 30: Mit 3-Zustandsmodell aus Formel 25 berechnete relative Diffusionskonstanten  $1/R_H$ , relative hydrodynamische Radii und scheinbare Molekülmassen für die drei Zustände von  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$  bei Normaldruck**

<sup>a</sup> Mit 3-Zustandsmodell aus Formel 25 berechnete relative Diffusionskonstanten  $1/R_H$ . Die mit Formel 22 berechneten Werte im 3-Zustandsmodell im schnellen Austausch für  $\Delta G^0$ - und  $\Delta V^0$  aus Tabelle 29 wurden in Formel 25 eingesetzt und damit die während der Druckreihe gemessenen relativen Diffusionskonstanten  $1/R_H$  (vgl. Tabelle 28 für Werte  $R_H$ ) im 3-Zustandsmodell gefittet.

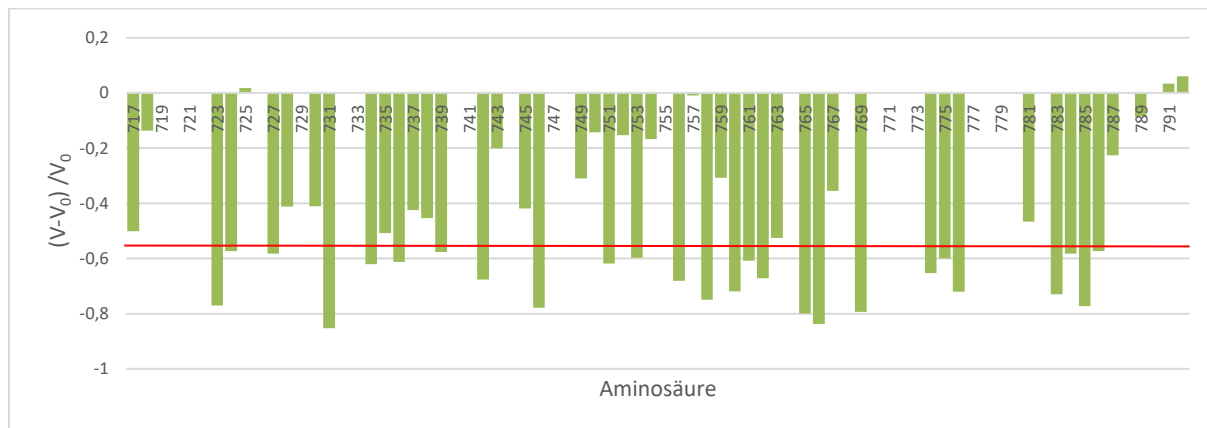
<sup>b</sup> aus den relativen Diffusionskonstanten  $1/R_H$  errechnete relative hydrodynamische Radii von  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$ .

<sup>c</sup> aus den relativen Diffusionskonstanten  $1/R_H$  mit Formel 14 errechnete scheinbare Molekülmassen für  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$ . Für DSS wurde der Kehrwert  $1/R_H$   $2.890 \pm 0.033\ \text{nm}^{-1}$  des von Wierschem für DSS experimentell ermittelten hydrodynamischen Radius für DSS  $0.346 \pm 0.004\ \text{nm}$  verwendet

<sup>d</sup> auf Basis der Sequenz berechnete Molekülmasse des Monomers von PC2(717-792) einschließlich zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

#### 4.2.6 Volumenänderungen der Signale von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) im HSQC-Spektrum bei 40 MPa im Vergleich zum Ausgangsspektrum bei 1 MPa

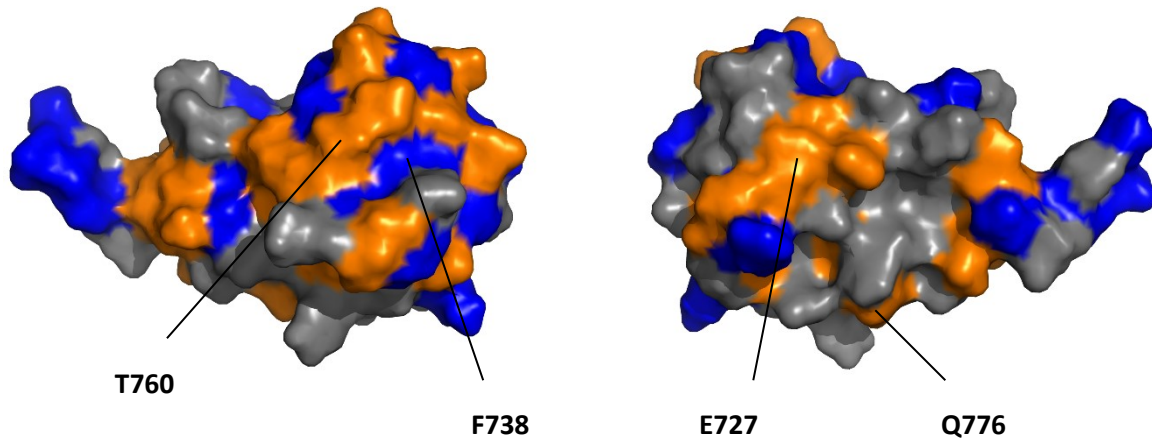
In Abbildung 52 werden die Veränderungen der Signalvolumina  $V_0 - V_{40 \text{ MPa}}/V_0$  bei 40 MPa Druck im Vergleich zum Ausgangsspektrum bei 1 MPa gezeigt und in Abbildung 53 auf die Struktur geplottet. Es sind in allen Bereichen des Proteins starke Änderungen der Signalvolumina zu beobachten.



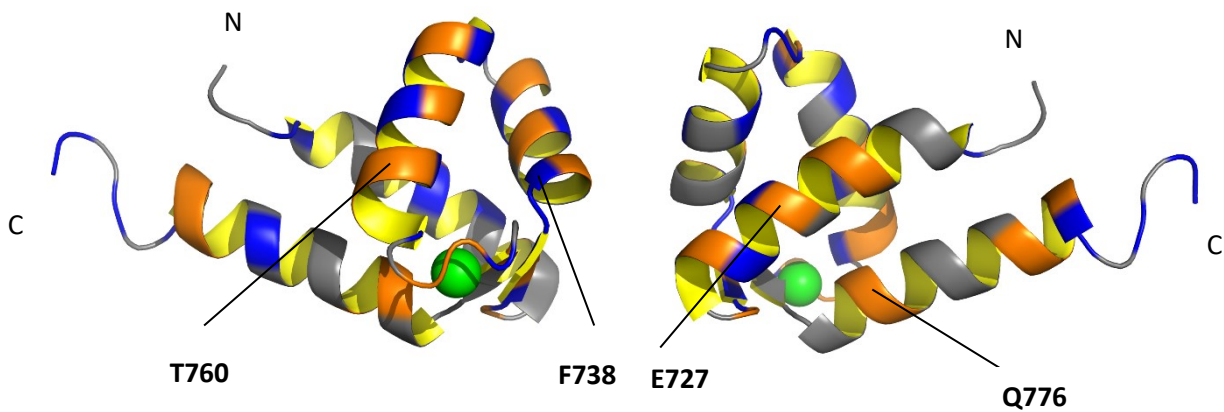
**Abbildung 52: Volumenänderungen der Signale von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) im HSQC-Spektrum bei 40 MPa im Vergleich zum Ausgangsspektrum bei 1 MPa**

Gezeigt werden die Veränderungen der Signalvolumina bei 40 MPa Druck im Vergleich zum Ausgangsspektrum bei 1 MPa ( $V_0 - V_{40 \text{ MPa}}/V_0$ ) von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792). Das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{korrr}}$  ist durch die rote Linie dargestellt ( $\sigma_0^{\text{korrr}} = 0,55$ ). Messbedingungen:  $V=300 \mu\text{l}$ ,  $400 \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.5$ ,  $10 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20 \text{ mM}$  Tris,  $150 \text{ mM}$  KCl,  $1 \text{ mM}$  DTT,  $1 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25 \mu\text{M}$  AEBSF,  $50 \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem  $800 \text{ MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 8. Datenprozessierung für die Auswertung der chemischen Verschiebungen: SI (F2: 2048, F1: 2048); EM-Filter mit LB (F2: 3, F1: 3).

A)



B)



**Abbildung 53: Volumenänderungen der Signale der Aminosäuren von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) bei 40 MPa geplottet auf die 3D-Struktur PDB: 2Y4Q**

(A) Oberflächendarstellung: Gezeigt werden in orange die Volumenänderungen  $(V_{40 \text{ MPa}} - V_0)/V_0$  oberhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}.$  Volumenänderungen unterhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}.$  sind blau eingefärbt. Graue Bereiche enthalten keine Information aus den NMR-Messungen. . (B) Cartoondarstellung von A. Das Kalziumion in der kanonischen EF-Hand ist in grün eingezeichnet.

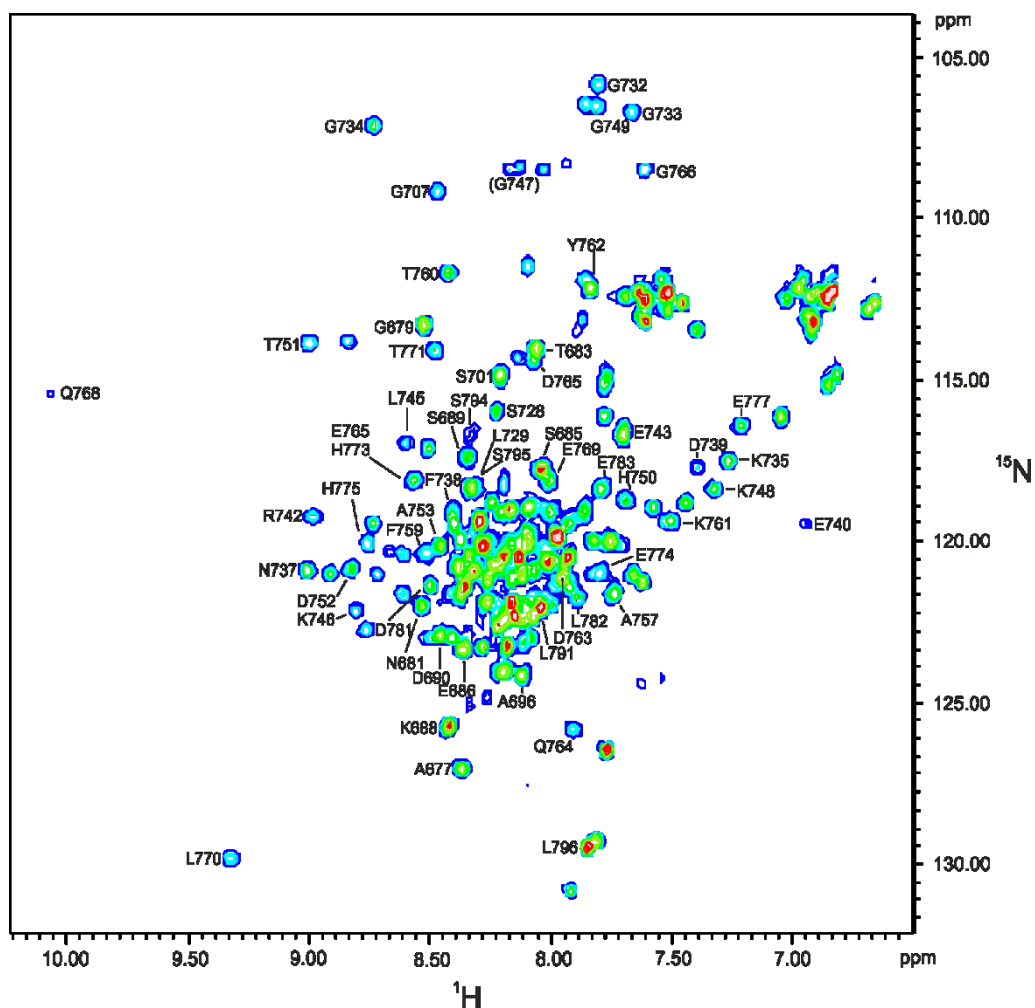
### **4.3 Interaktion verschiedener Fragmente von PC2 mit dem Formin mDia1(69-451)**

#### **4.3.1 Interaktion von $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) mit dem Formin mDia1(69-451)**

Rundle et al konnten bereits 2004 eine Interaktion von PC2 mit dem Formin mDia nachweisen. Dabei bindet der cytosolische C-Terminus von PC2 (im Bereich nach Glu871) den N-Terminus von mDia bei AS 143-260 (Rundle et al., 2004). Bai et al. 2008 stellten zudem fest, dass mDia bei physiologischen Ruhepotentialen spezifisch an PC2 bindet und es dadurch blockiert (Bai et al., 2008; Tsiokas, 2009). Auch Eberhardt konnte eine Interaktion des C-terminalen Abschnitts PC2(680-796) mit mDia1(69-451) zeigen und dabei beobachten, dass mDia1(69-451) mit dem Bereich der EF-Hände von PC2(680-796) interagiert (Eberhardt, 2011). Allerdings waren bei den Experimenten von Eberhardt die beiden EF-Hände vermutlich nicht vollständig mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gesättigt, da sich nur 0,21 mM Kalzium in der Probe befand. Wie aus den Titrationsversuchen mit Kalzium ersichtlich (4.1.3), ist man bei dieser Konzentration ohne Hochsalz vom Bereich der Kalziumsättigung von PC2(680-796) entfernt, was möglicherweise die vollständige Ausbildung der Struktur des Proteins verhindern könnte und zur Folge hat, dass im HSQC-Spektrum weniger Signale zu sehen sind. Von Schumann et al. und Allen et al. ist bekannt, dass die Spektren ohne Kalzium in der Probe weniger Signale zeigen (Allen et al., 2014; Schumann et al., 2009a). Im Folgenden wurde für die Titrationsexperimente mit dem Formin mDia1(69-451) eine Kalziumkonzentration von 10 mM Kalzium gewählt.

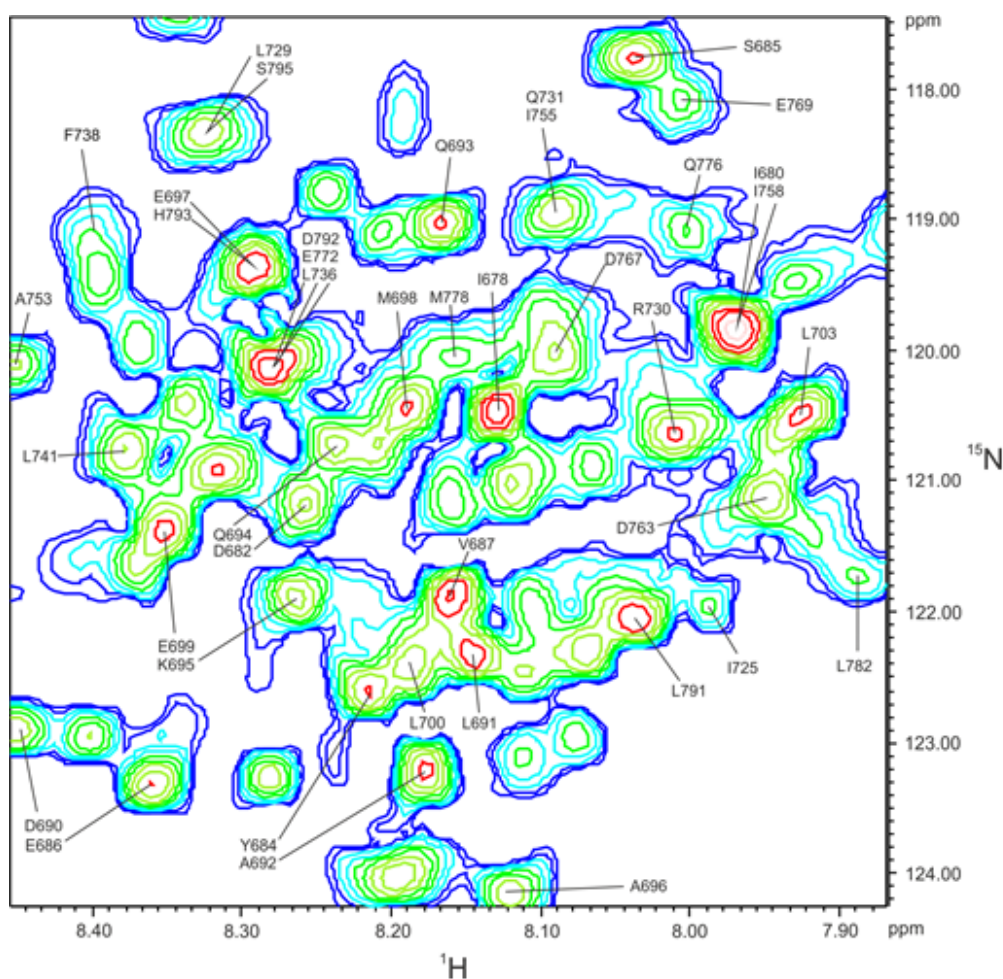
##### ***4.3.1.1 Übertragung der Zuordnung von PC2(680-796) im $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum auf die Titrationsbedingungen***

Die Übertragung der Zuordnung für PC2(680-796) im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum erfolgte anhand der Peakliste von Schumann (Schumann et al., 2009b) unter Einbeziehung der verbesserten Zuordnung von Eberhardt (Eberhardt, 2011). Die zwei großen Bereiche AS708-724 und AS784-789 sowie einige weitere einzelne Aminosäuren konnten von Schumann und Eberhardt nicht zugeordnet und somit nicht übertragen werden. Bei einigen Peaks ist zudem in Ansätzen eine Aufspaltung in zwei Zustände zu beobachten. Abbildung 54 und Abbildung 55 zeigen die übertragene Zuordnung der Aminosäuren von  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) im HSQC-Spektrum unter den in dieser Arbeit verwendeten neuen Bedingungen bei 1 mM PC2(680-796).



**Abbildung 54: HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796)**

Gezeigt wird die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796)-Signale. Messbedingungen:  $V = 500\ \mu\text{l}$ , 1 mM PC2(680-796),  $T = 298\ \text{K}$ , pH 7.46, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Aufgenommen mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 128); NS 16. Datenprozessierung: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).



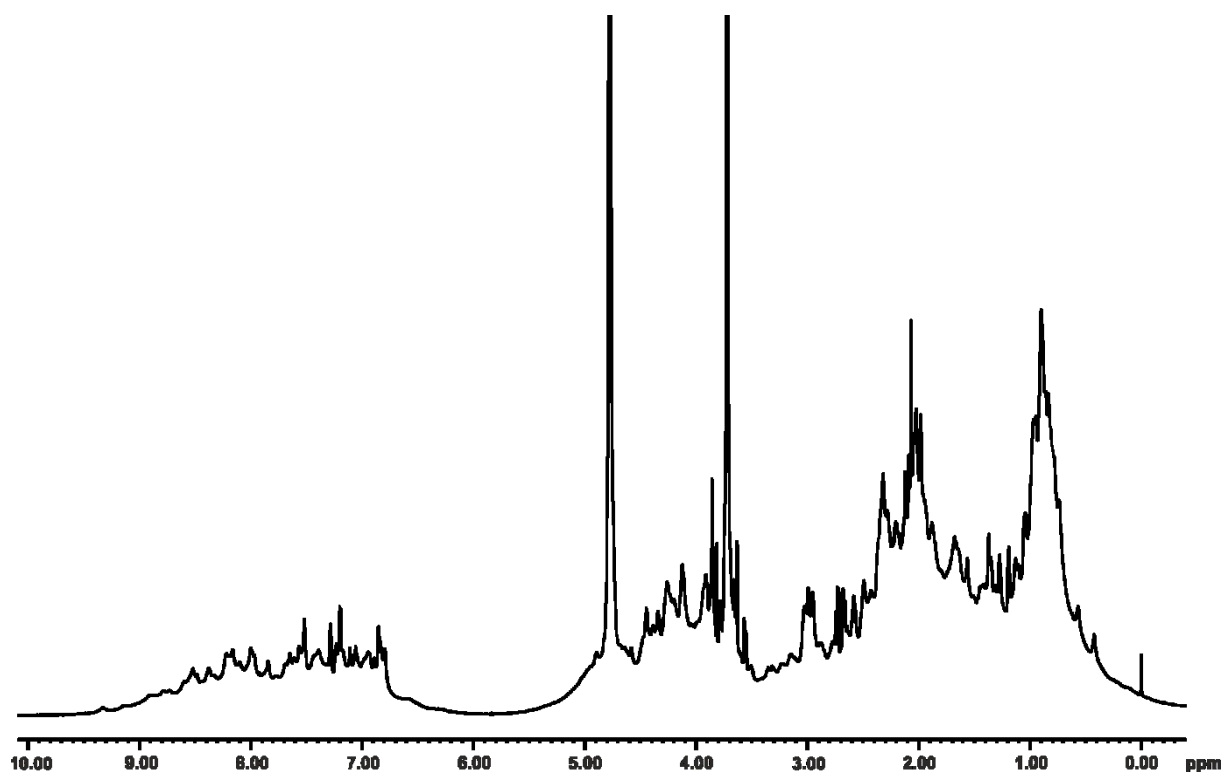
**Abbildung 55: HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) vergrößerter Ausschnitt**

Gezeigt wird die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796)-Signale im mittleren Bereich des Spektrums. Messbedingungen:  $V = 500 \mu\text{l}$ , 1 mM PC2(717-792),  $T = 298 \text{ K}$ , pH 7.46, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Aufgenommen mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 128); NS 16. Datenprozessierung: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).

#### 4.3.1.2 Titration von $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) mit dem Formin mDia1(69-451)

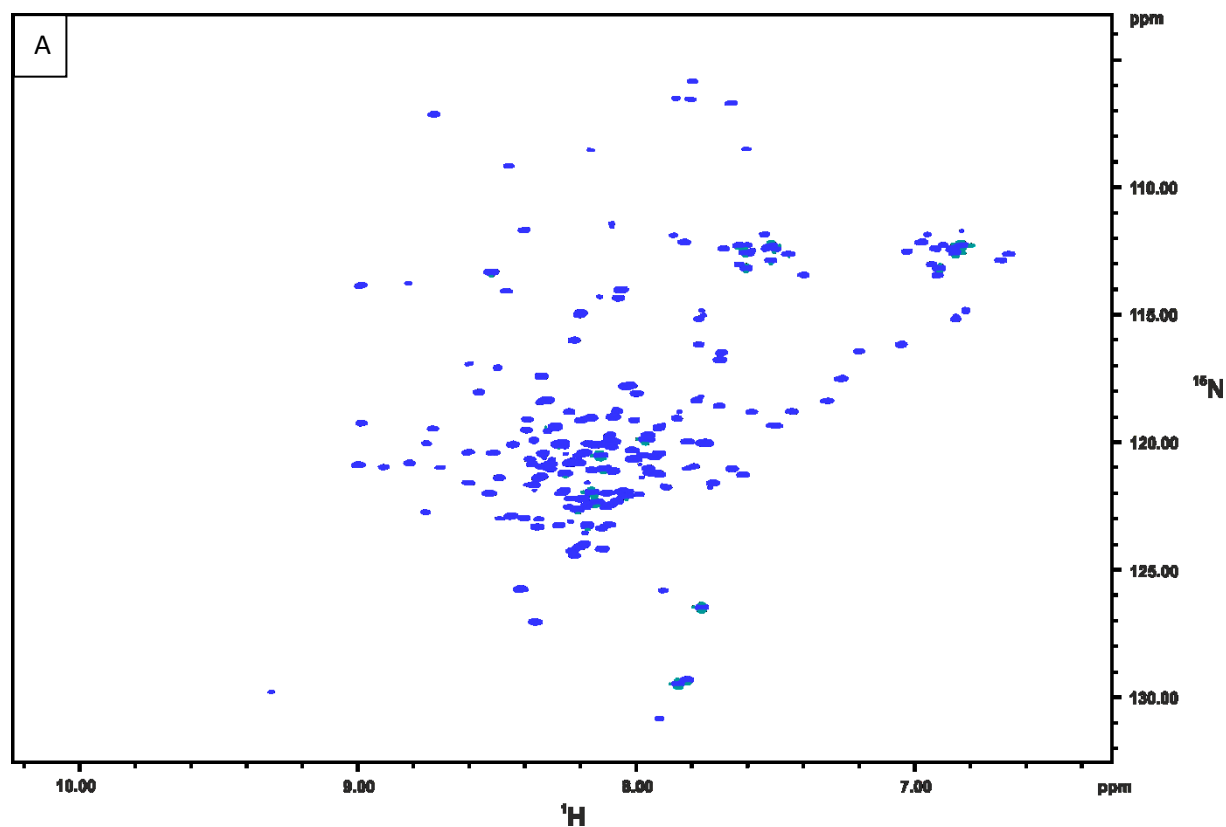
Für die Titration mit dem Formin mDia1(69-451) wurde die Konzentration von PC2(680-796) bei 60  $\mu\text{M}$  gewählt. Sie liegt damit in etwa im Bereich des von Eberhardt berechneten durchschnittlichen  $K_D$ -Wertes von  $39,3 \pm 13,7 \mu\text{M}$  für die Komplexbildung von PC2(680-796) mit mDia1(69-451) (Eberhardt, 2011). Eine geringere Konzentration hätte die Auswertung der Spektren stark erschwert. Im Verlauf der Titration wurde schrittweise mDia1(69-451) bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  (fünffacher molarer Überschuss) zugegeben. Die Durchführung und Auswertung der Titration erfolgte wie in 3.5.6 beschrieben. Abbildung 56 zeigt ein 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum des Formins mDia1(69-451).

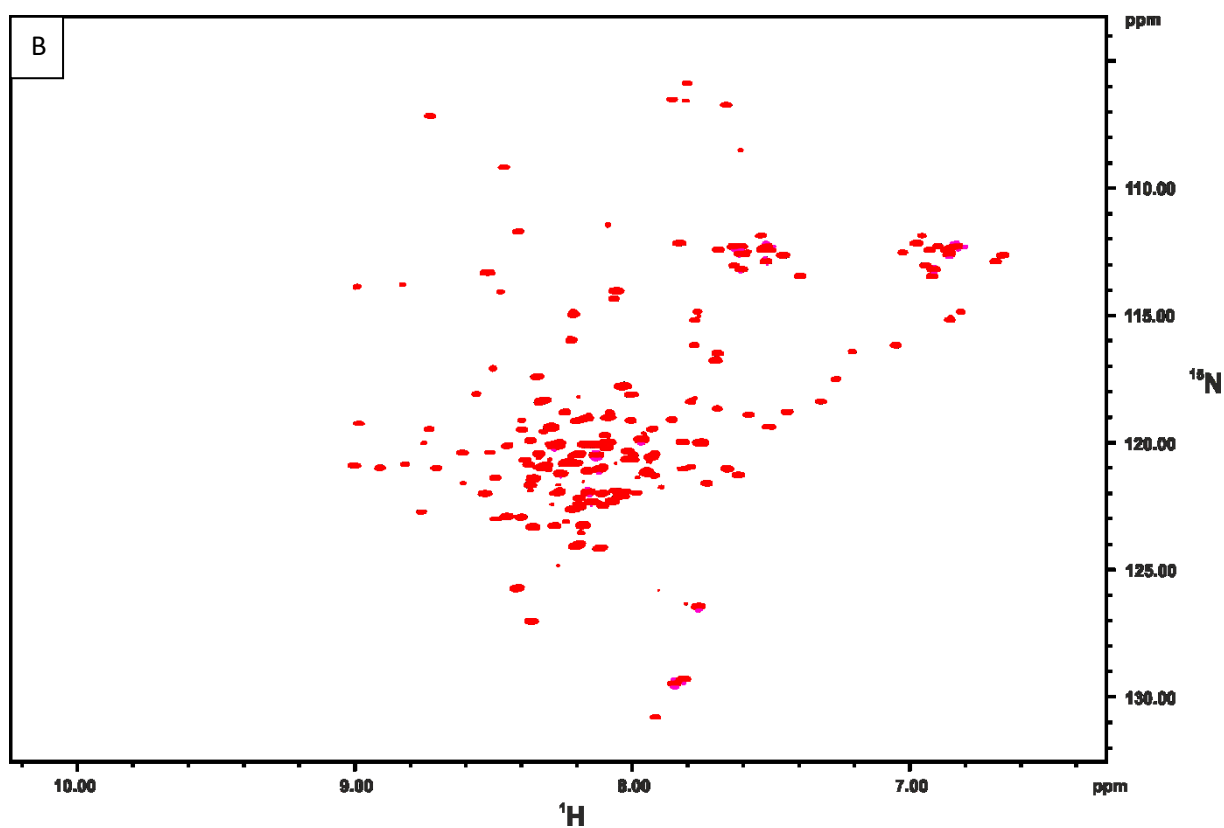




**Abbildung 56: 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum von mDia1(69-451)**

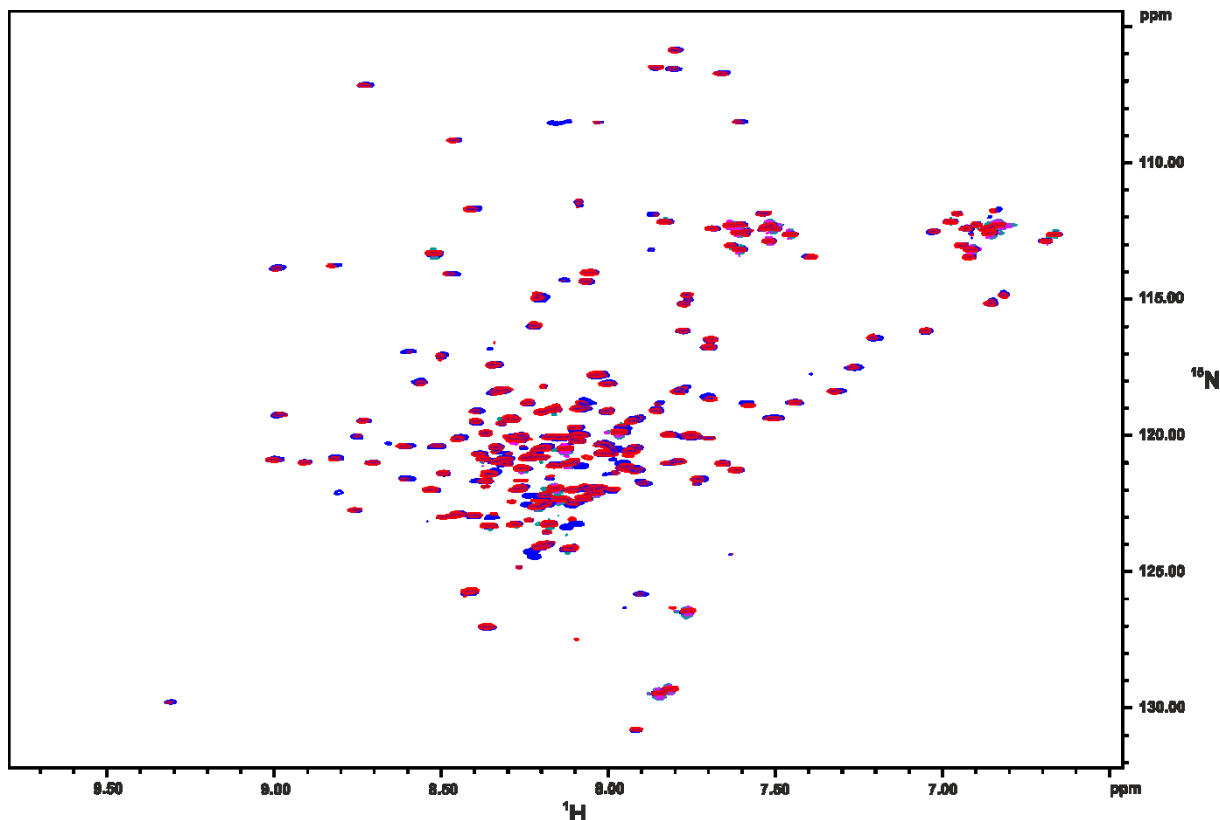
Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ , 0.8 mM mDia1(69-451),  $T = 298\text{K}$ , pH 7.46, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 65536; NS 64. Datenprozessierung: SI: 131072; EM-Filter mit  $\text{LB} = 1.00$ .





**Abbildung 57:  $^1\text{H}$ -  $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von (A) freiem  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) und (B)  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) im Komplex mit mDia1(69-451) bei fünffachem molaren Überschuss mDia1(69-451) in der Probe.**

Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.46$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).

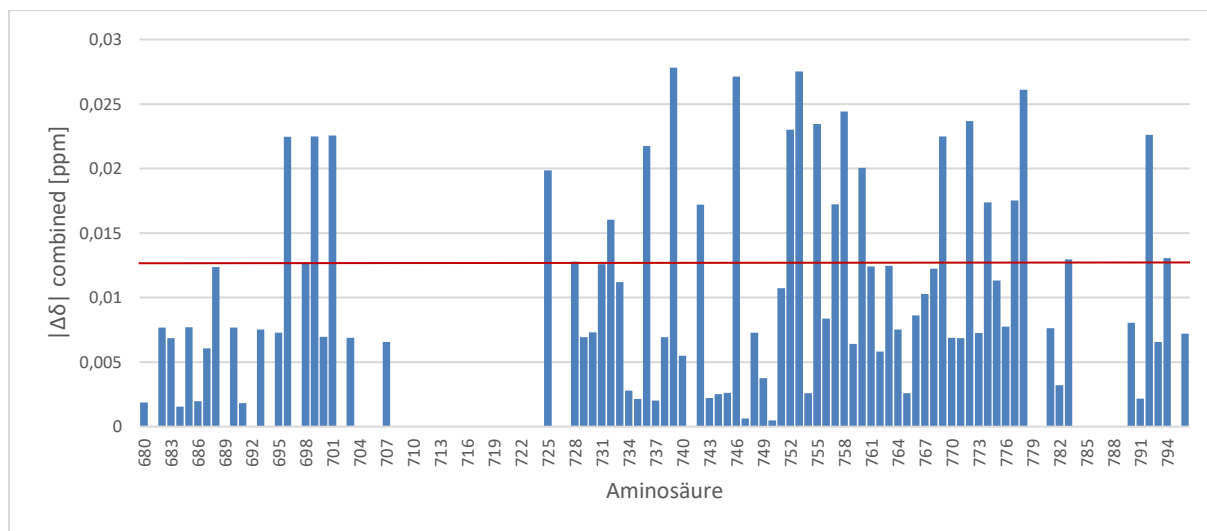


**Abbildung 58:** Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von freiem  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) [blau] und  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) im Komplex mit mDia1(69-451) bei fünffachem Überschuss mDia1(69-451) [rot] in der Probe.

Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.46$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).

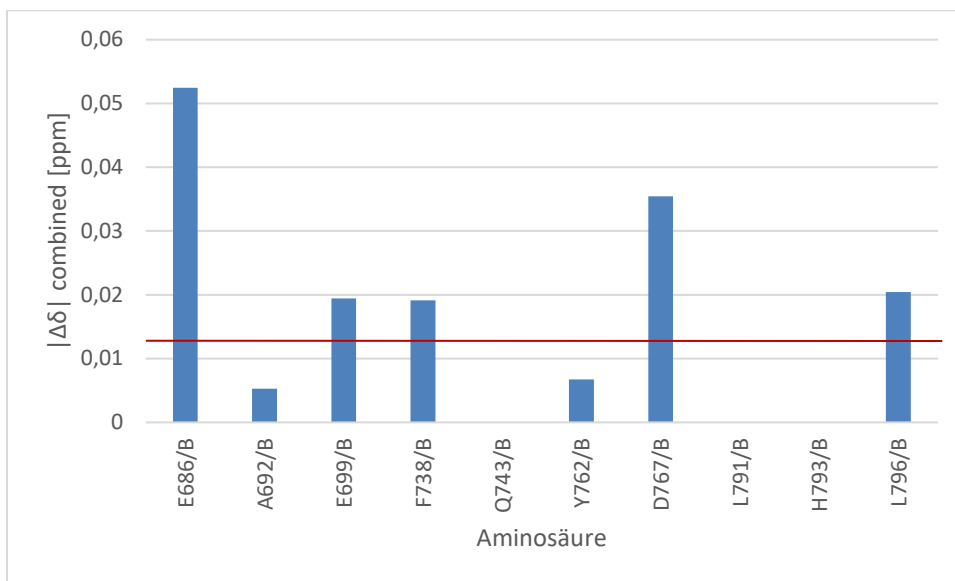
Abbildung 57 zeigt  $^{15}\text{N}$ -gelabeltes PC2(680-796) ohne (A) und mit fünffachem Überschuss mDia1(69-451) in der Probe (B). Abbildung 58 zeigt die Überlagerungsdarstellung dieser beiden Spektren. Es lassen sich einerseits chemische Verschiebungsänderungen und andererseits eine Abnahme der Volumina der PC2(680-796)-Signale beobachten. Einige Aminosäuren zeigen ohne mDia1 in der Probe zwei Zustände. Dies war schon in Ansätzen bei der hohen Konzentration von  $1\ \text{mM}$  PC2 zu sehen (4.3.1.1), wird jedoch deutlicher bei der Konzentration von  $60\ \mu\text{M}$  PC2(680-796), da hier die Signale im Spektrum getrennt voneinander sichtbar sind. Es wurden die kombinierten chemischen Verschiebungen aus der  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Dimension nach Schumann et al. sowie die Änderungen der Signalvolumina ausgewertet (Schumann, 2007). Abbildung 59 zeigt die kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5. Abbildung 60 zeigt die kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der verfolgten Signale der zweiten Zustände. Dargestellt ist der Betrag der chemischen Verschiebungsänderung für jede Aminosäure beim Verhältnis 1:5 im Vergleich zum Referenzspektrum ohne mDia1(69-451) in der Probe. Die rote Linie zeigt  $\sigma_0^{\text{kor}}$ , das korrigierte Signifikanzniveau nach Schumann, an (Schumann, 2007).  $\sigma_0^{\text{kor}}$  wurde für die kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen aller verfolgten Signale inklusive der zweiten Zustände bestimmt. Alle Aminosäuren, die Änderungen in den Beträgen der chemischen Verschiebung größer als  $\sigma_0^{\text{kor}}$  aufwiesen, wurden als signifikant und in Bezug auf die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung als relevant eingestuft. Die größten kombinierten chemischen

Verschiebungsänderungen sind im Bereich des Linkers zwischen den beiden EF-Handen sowie bei den beiden EF-Handen selbst zu beobachten (Abbildung 59). Bei den verfolgbaren zweiten Zuständen zeigen zwei Aminosäuren (E686/B, E699/B) aus den vorhergesagten N-terminalen  $\alpha$ -helikalen Bereichen sowie F738 (EF-Hand 1), D767 (EF-Hand 2) und die letzte Aminosäure des Fragments L796 signifikante Änderungen (Abbildung 60).



**Abbildung 59: Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(680-796) zu mDia1(69-451)]**

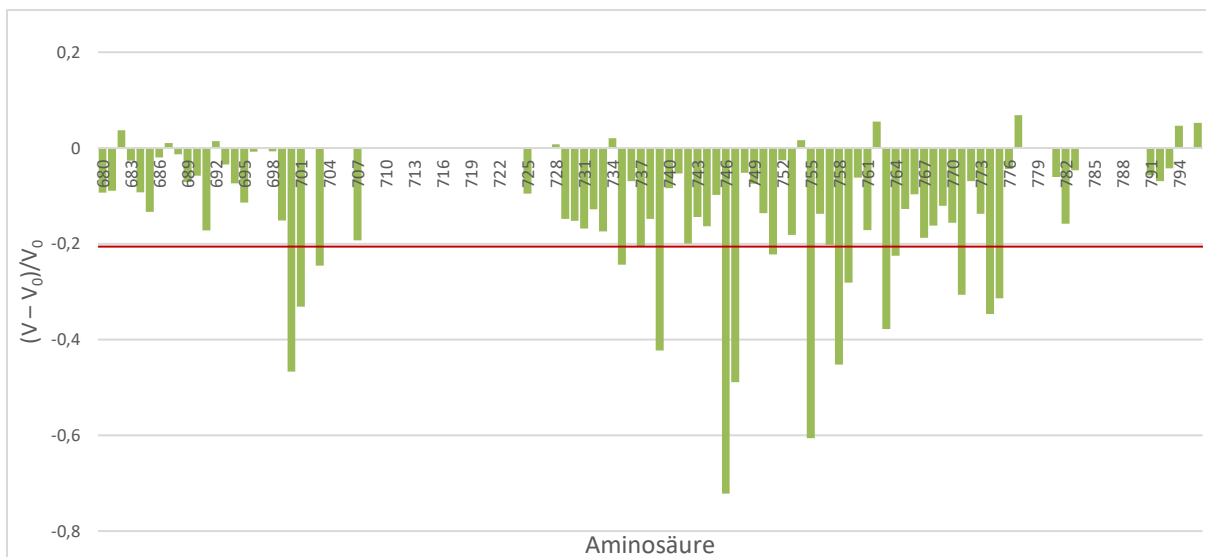
Gezeigt werden die Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der PC2(680-796)-Signale durch die Zugabe von fünffach molarem Überschuss mDia1(59-451). Für Aminosäuren mit zwei Zuständen wird hier nur der stärker populierte Zustand A dargestellt. Der schwächer populierte Zustand B ist in Abbildung 60 aufgeführt. Das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}} = 0,01276$  für die kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen aller Zustände ist durch die rote Linie dargestellt ( $\sigma_0^{\text{kor}} = 0,01276$ ). Messbedingungen: V=500  $\mu\text{l}$ , 60  $\mu\text{M}$  PC2(680-796), T = 298K, pH 7.46, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 25  $\mu\text{M}$  AEBSF, 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Auswertung der chemischen Verschiebungen: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).



**Abbildung 60: Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der identifizierten und verfolgbaren zweiten Zustände (bezeichnet als Zustände B) des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(680-796) zu mDia1(69-451)]**

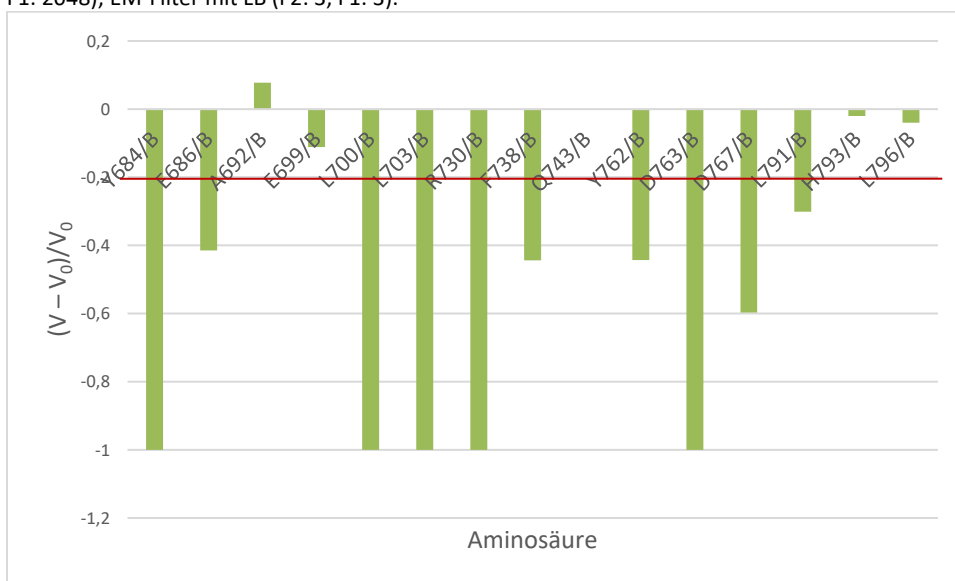
Gezeigt werden die Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der PC2(680-796)-Signale der zweiten Zustände (bezeichnet als Zustände B) durch die Zugabe von fünffach molarem Überschuss mDia1(59-451). Das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}} = 0,01276$  für die kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen aller Zustände ist durch die rote Linie dargestellt ( $\sigma_0^{\text{kor}} = 0,01276$ ). Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.46$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Auswertung der chemischen Verschiebungen: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).

Abbildung 61 zeigt die Volumenänderungen der Signale der Aminosäuren des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 im Vergleich zum Referenzspektrum ohne mDia1(69-451) in der Probe. Abbildung 62 zeigt die Volumenänderungen der Signale der identifizierten zweiten Zustände B. Berechnet wurde  $(V - V_0)/V_0$ , wobei  $V_0$  das Signalvolumen ohne mDia1 in der Probe und  $V$  das Signalvolumen bei der höchsten mDia1-Konzentration darstellt. Die rote Linie zeigt  $\sigma_0^{\text{kor}}$ , das korrigierte Signifikanzniveau nach Schumann, an (Schumann, 2007).  $\sigma_0^{\text{kor}}$  wurde für die Volumenänderungen aller verfolgten Signale inklusive der zweiten Zustände bestimmt. Alle Aminosäuren, die Volumenänderungen größer als  $\sigma_0^{\text{kor}}$  aufwiesen, wurden als signifikant und in Bezug auf die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung als relevant eingestuft.



**Abbildung 61: Volumenänderungen der Signale des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(680-796) zu mDia1(69-451)]**

Gezeigt werden die Veränderungen der Signalvolumina  $(V - V_0)/V_0$  von PC2(680-796) in den HSQC-Spektren durch die Zugabe von fünffach molarem Überschuss mDia1(59-451). Für Aminosäuren mit zwei Zuständen wird hier nur der stärker populierte Zustand A dargestellt. Der schwächer populierte Zustand B ist in Abbildung 62 aufgeführt. Das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  für die Volumenänderungen aller Zustände ist durch die rote Linie dargestellt ( $\sigma_0^{\text{kor}} = 0,208$ ). Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.46$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Volumenauswertung: SI (F2: 2048, F1: 2048); EM-Filter mit LB (F2: 3, F1: 3).



**Abbildung 62: Volumenänderungen der Signale der identifizierten zweiten Zustände (bezeichnet als Zustände B) des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(680-796) zu mDia1(69-451)]**

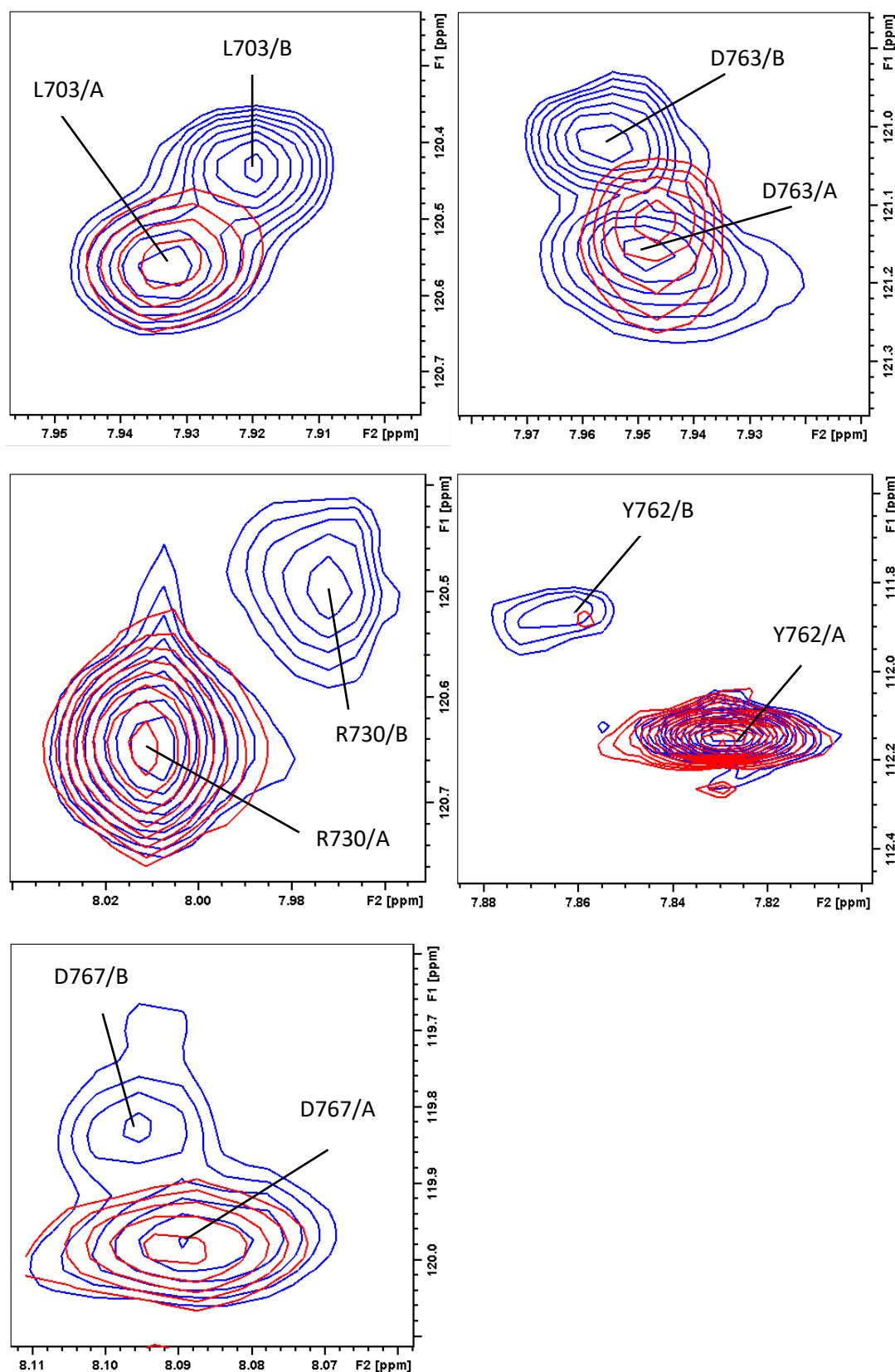
Gezeigt werden die Veränderungen der Signalvolumina  $(V - V_0)/V_0$  der identifizierten zweiten Zustände (bezeichnet als Zustände B) von PC2(680-796) in den HSQC-Spektren durch die Zugabe von fünffach molarem Überschuss mDia1(59-451). Das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  für die Volumenänderungen aller Zustände ist durch die rote Linie dargestellt ( $\sigma_0^{\text{kor}} = 0,208$ ). Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.46$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Volumenauswertung: SI (F2: 2048, F1: 2048); EM-Filter mit LB (F2: 3, F1: 3).

Die stärksten Volumenänderungen durch die mDia1-Zugabe sind für die zweiten Zustände einiger Aminosäuren zu beobachten. Dies trifft vor allem auf die Aminosäuren Y684/B, L700/B, L703/B im vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Bereich sowie auf R730/B aus EF-Hand 1 und D763/B aus EF-Hand 2 zu. Tabelle 31 zeigt die ermittelten Populationen A und B für Aminosäuren mit identifizierten zweiten Zuständen vor mDia1-Zugabe. Die mittlere Population ergibt für die Zustände A den Wert 0,72 und für die Zustände B den Wert 0,28. Dieses Verhältnis entspricht ungefähr den schon in den Kalziumtitrationen beobachteten Verhältnissen der zwei Zustände A und B einiger Aminosäuren von PC2(680-796) bei Kalziumsättigung (vgl. 4.1.3). Für Y762 wurde bereits mittels  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY- und  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY in früheren Experimenten gezeigt, dass es in zwei Zuständen vorliegt (vgl. 4.1.1 und (Eberhardt, 2011)).

Aminosäure	Population	
	A	B
Y684	0,85	0,15
E686	0,79	0,21
A692	0,88	0,12
E699	0,74	0,26
L700	0,77	0,23
L703	0,60	0,40
R730	0,69	0,31
F738	0,64	0,36
Q743	0,65	0,35
Y762	0,75	0,25
D763	0,69	0,31
D767	0,62	0,38
L791	0,54	0,46
H793	0,91	0,09
L796	0,61	0,39

**Tabelle 31: Populationen A und B für Aminosäuren mit identifizierten zweiten Zuständen**

In Abbildung 63 sind die Zustände A und B der Aminosäuren L703, D763, R730, Y762 und D767 dargestellt. In blau gezeigt werden die Zustände A und B der Aminosäuren ohne mDia1 in der Probe. Die Populationen betragen 60 : 40 % für L703, 61 : 39 % für D763, 69 : 31 % für R730, 75 : 25 % für Y762 und 62 : 38 % für D767. Durch die Zugabe von fünffachem molaren Überschuss mDia1(69-451) verringern die als Zustände B zugeordneten Signale stark ihr Volumen bzw. sind im Spektrum nicht mehr sichtbar. Die Integrale der Zustände A zeigen weniger starke Änderungen (vgl. Abbildung 61, Abbildung 62).



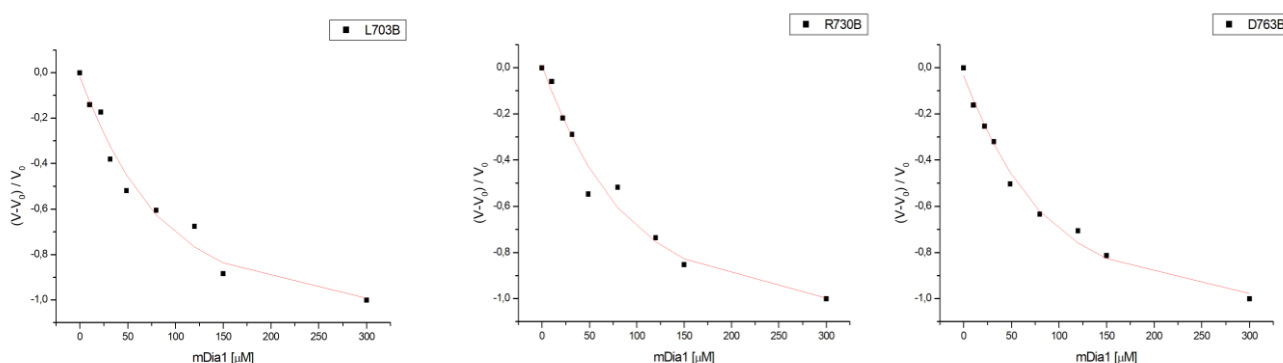
**Abbildung 63:** Überlagerungsdarstellung der Zustände A und B der Signale L703, D763, R730, Y762 und D767 von freiem [blau]  $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) und bei fünffachem Überschuss mDia1(69-451) in der Probe [rot]

Gezeigt werden die Veränderungen der Signalvolumina der Zustände A und B der Signale L703, D763, R730, Y762 und D767 von PC2(680-796) in den HSQC-Spektren durch die Zugabe von fünffach molarem Überschuss mDia1(59-451). Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.46$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer



aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Volumenauswertung: SI (F2: 2048, F1: 2048); EM-Filter mit LB (F2: 3, F1: 3).

Anhand der Abnahme der Signalvolumina der Zustände B der Aminosäuren L703 (vorausgesagter  $\alpha$ -helikaler Bereich), R730 (atypische EF-Hand 1) und D763 (kanonische EF-Hand 2) wurden  $K_D$ -Werte für die Komplexbildung von PC2(680-796) mit mDia1 errechnet. Dazu wurden die Volumina der Signale gegen die mDia1-Konzentration geplottet und mit Formel 19 gefittet (Abbildung 64). Die berechneten  $K_D$ -Werte sind in Tabelle 32 aufgeführt. Es ergibt sich ein mittlerer  $K_D$ -Wert von  $43 \pm 20$   $\mu\text{M}$  für die Interaktion von PC2(680-796) mit mDia1(59-451).



**Abbildung 64: Änderungen der Signalvolumina der Zustände B von L703, R730 und D763 durch die mDia1-Zugabe**

Gezeigt werden die Änderungen der Signalvolumina der Zustände B der Aminosäuren L703, R730 und D763 durch die mDia1-Zugabe. Die Daten wurden mit Formel 19 gefittet. Messbedingungen:  $V=500$   $\mu\text{L}$ ,  $60$   $\mu\text{M}$  PC2(680-796),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH}$  7.46,  $10$   $\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.5$   $\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20$   $\text{mM}$  Tris,  $150$   $\text{mM}$  KCl,  $1$   $\text{mM}$  DTT,  $1$   $\text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25$   $\mu\text{M}$  AEBSF,  $50$   $\mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300$   $\mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800$   $\text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Volumenauswertung: SI (F2: 2048, F1: 2048); EM-Filter mit LB (F2: 3, F1: 3).

	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]
<b>L703/B</b>	$41 \pm 19$
<b>R730/B</b>	$46 \pm 21$
<b>D763/B</b>	$42 \pm 12$

**Tabelle 32:  $K_D$ -Werte für die Interaktion von PC2(680-796) mit mDia1(69-451)**

Abbildung 65 zeigt in der Sequenz die Aminosäuren mit Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen oder der Signalvolumina oberhalb des Signifikanzniveaus  $\sigma_0^{\text{kor}}$  in rot und unterhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$  in blau. Konnte ein zweiter Zustand B für die jeweilige Aminosäure beobachtet werden, ist dieser in Reihe B (Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen) bzw. D (Änderungen der Signalvolumina) aufgeführt. Grau markierte Aminosäuren weisen auf ein nicht zugeordnetes oder im Verlauf der Titration nicht verfolgbares Signal hin. Die beiden EF-Hände sind hellgrün eingezeichnet, die vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Bereiche in rot. In Reihe E wurden die Effekte aus den kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen und den Volumenänderungen zusammengefasst, wobei alle Effekte oberhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$  gleich behandelt werden.

	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702
A	I	N	D	T	Y	S	E	V	K	S	D	L	A	Q	Q	K	A	E	M	E	L	S	D
B							E						A							E			
C	I	N	D	T	Y	S	E	V	K	S	D	L	A	Q	Q	K	A	E	M	E	L	S	D
D					Y		E						A							E	L		
E	I	N	D	T	Y	S	E	V	K	S	D	L	A	Q	Q	K	A	E	M	E	L	S	D

	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725
A	L	I	R	K	G	Y	H	K	A	L	V	K	L	K	L	K	K	N	T	V	D	D	I
B																							
C	L	I	R	K	G	Y	H	K	A	L	V	K	L	K	L	K	K	N	T	V	D	D	I
D	L																						
E	L	I	R	K	G	Y	H	K	A	L	V	K	L	K	L	K	K	N	T	V	D	D	I

	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748
A	S	E	S	L	R	Q	G	G	G	K	L	N	F	D	E	L	R	Q	D	L	K	G	K
B													F					Q					
C	S	E	S	L	R	Q	G	G	G	K	L	N	F	D	E	L	R	Q	D	L	K	G	K
D					R								F					Q					
E	S	E	S	L	R	Q	G	G	G	K	L	N	F	D	E	L	R	Q	D	L	K	G	K

	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771
A	G	H	T	D	A	E	I	E	A	I	F	T	K	Y	D	Q	D	G	D	Q	E	L	T
B														Y					D				
C	G	H	T	D	A	E	I	E	A	I	F	T	K	Y	D	Q	D	G	D	Q	E	L	T
D														Y	D				D				
E	G	H	T	D	A	E	I	E	A	I	F	T	K	Y	D	Q	D	G	D	Q	E	L	T

	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794
A	E	H	E	H	Q	Q	M	R	D	D	L	E	K	E	R	E	D	L	D	L	D	H	S
B																				L		H	
C	E	H	E	H	Q	Q	M	R	D	D	L	E	K	E	R	E	D	L	D	L	D	H	S
D																				L		H	
E	E	H	E	H	Q	Q	M	R	D	D	L	E	K	E	R	E	D	L	D	L	D	H	S

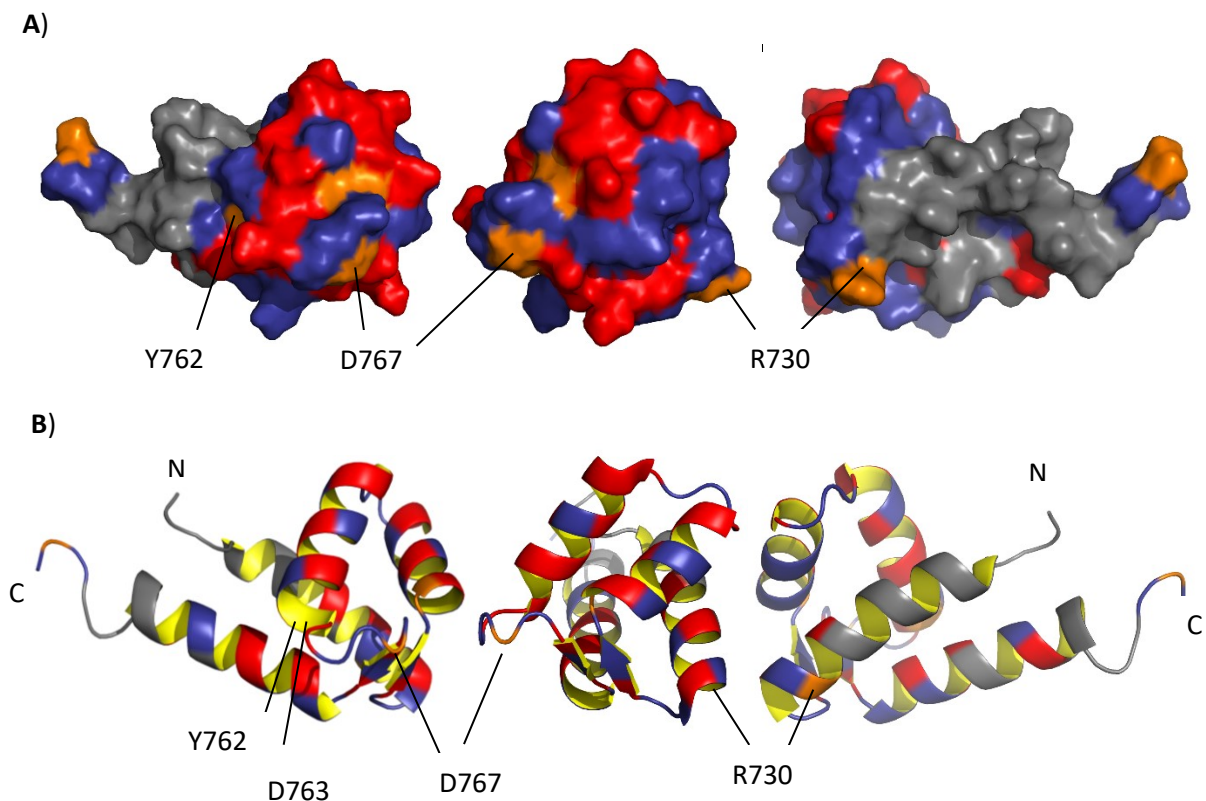
	795	796
A	S	L
B		L
C	S	L
D		L
E	S	L

- A** kombinierte chemische Verschiebungsänderungen Zustände A
- B** kombinierte chemische Verschiebungsänderungen Zustände B
- C** Volumenänderungen Zustände A
- D** Volumenänderungen Zustände B
- E** Zusammenfassung

**Abbildung 65: Kombinierte chemische Verschiebungsänderungen und Volumenänderungen von  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) sowie die Zusammenfassung der Effekte**

Reihe A: kombinierte chemische Verschiebungsänderungen Zustände A. Reihe B: kombinierte chemische Verschiebungsänderungen Zustände B. Reihe C: Volumenänderungen Zustände A. Reihe D: Volumenänderungen Zustände B. Reihe E: Zusammenfassung der Effekte. Die Aminosäuren mit Änderungen oberhalb von  $\sigma_0^{\text{korrr}}$  sind rot markiert. Blau steht für Änderungen unterhalb von  $\sigma_0^{\text{korrr}}$ . Grau bedeutet keine Zuordnung oder Signal im Verlauf der Titration nicht verfolgbar. Die beiden EF-Hände sind hellgrün eingezeichnet, die vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Bereiche in rot.

Alle Aminosäuren aus der Zusammenfassung in Abbildung 65 wurden im Anschluss auf die Strukturen von Schumann et al. und Allen et al. übertragen (Allen et al., 2014; Schumann et al., 2009b). Alle Aminosäuren mit Änderungen oberhalb des Signifikanzniveaus  $\sigma_0^{\text{korrr}}$  sind wiederum rot eingezeichnet. Blau steht für Änderungen unterhalb von  $\sigma_0^{\text{korrr}}$ . Grau bedeutet keine Zuordnung oder Signal im Verlauf der Titration nicht verfolgbar. Da die roten und orangen Bereiche auf der Struktur von PC2(680-796) die stärksten Effekte bei mDia1-Zugabe zeigen, stellen sie die wahrscheinlichen Interaktionsflächen mit mDia1 dar. Orange markiert sind die Bereiche, die nur in Zustand B signifikante Effekte zeigen.



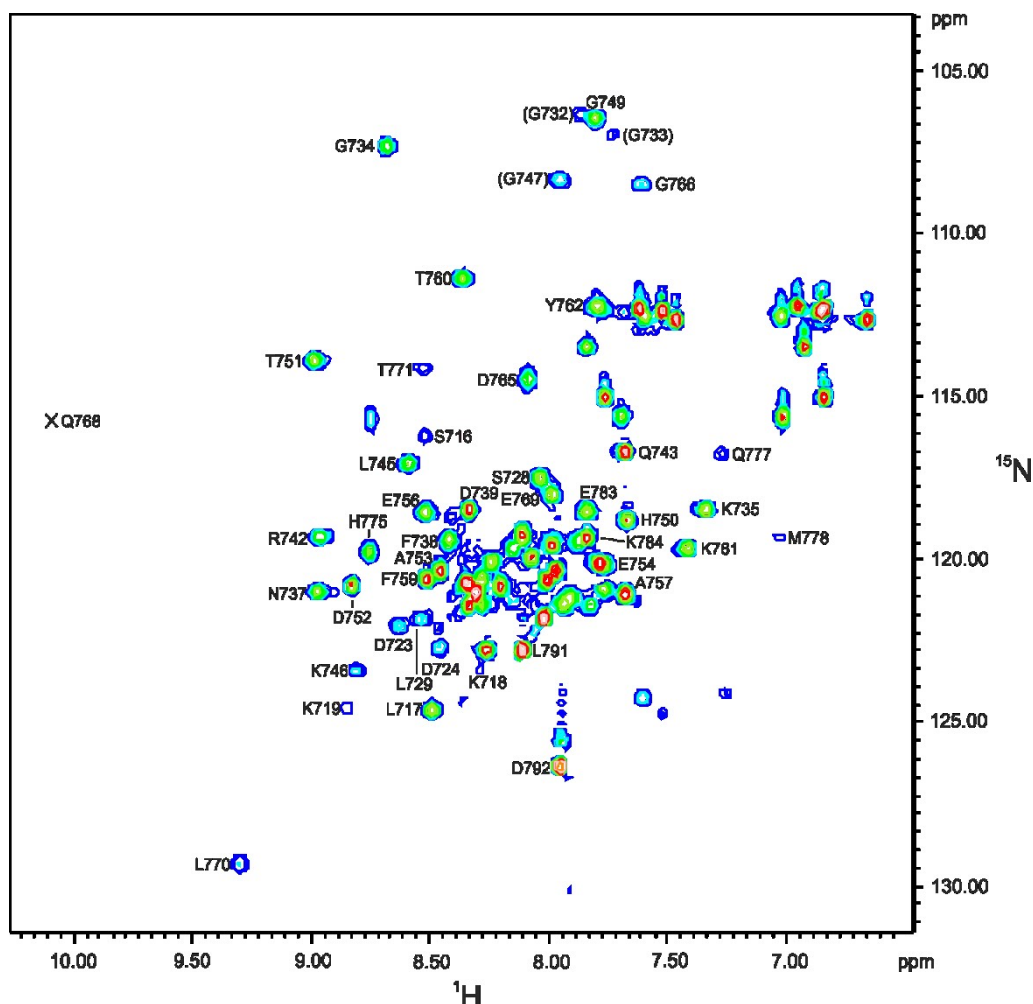
**Abbildung 66: Darstellung der Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderung und der Volumenänderungen der Signale von PC2(680-796) durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) auf der 3D-Struktur (PDB: 2Y4Q)**

(A) Oberflächendarstellung: Die Aminosäuren mit Änderungen oberhalb von  $\sigma_0^{\text{korrr}}$  sind rot markiert. Orange markiert sind die Aminosäuren, die nur in Zustand B Werte oberhalb von  $\sigma_0^{\text{korrr}}$  zeigen. Blau steht für Änderungen unterhalb von  $\sigma_0^{\text{korrr}}$ . Grau bedeutet keine Zuordnung oder Signal im Verlauf der Titration nicht verfolgbar. (B) Cartoondarstellung von A. Das Kalziumion in der kanonischen EF-Hand ist in grün eingezeichnet.

## 4.3.2 Interaktion von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) mit dem Formin mDia1(69-451)

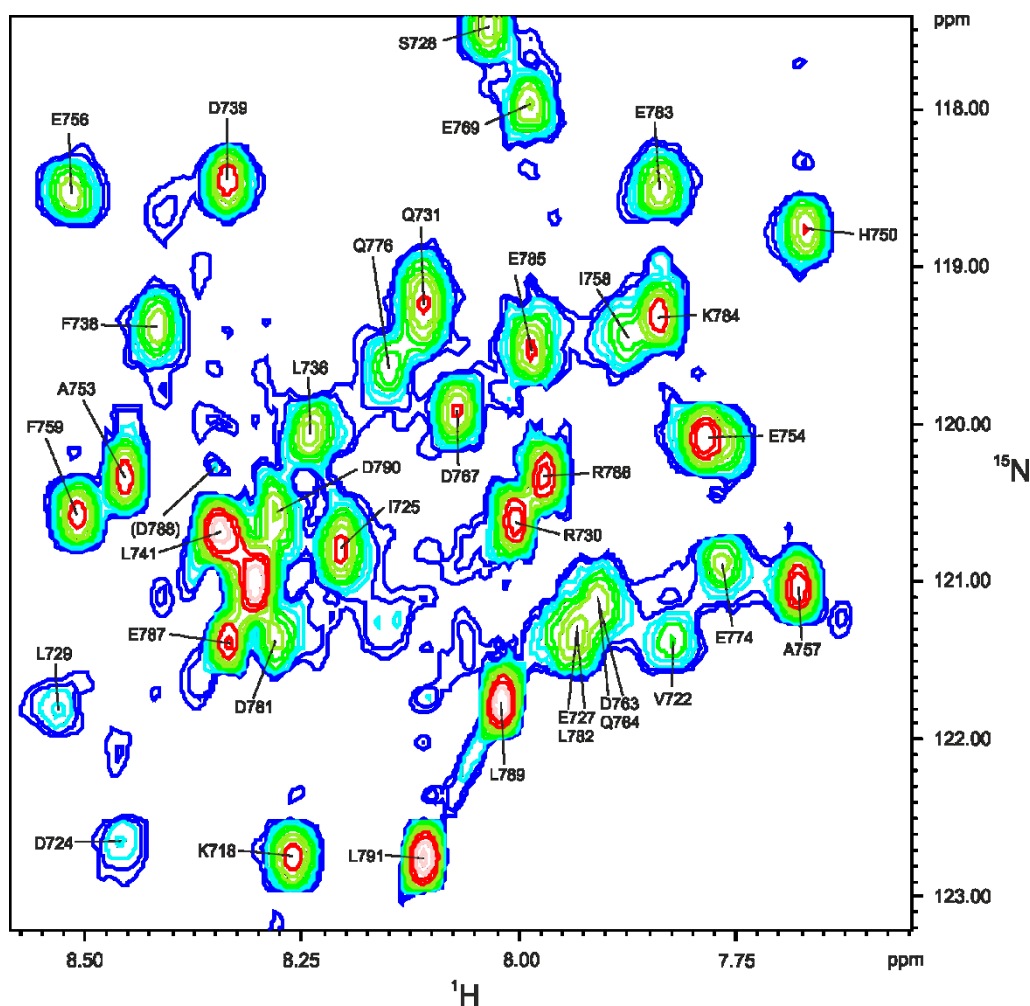
### 4.3.2.1 Übertragung der Zuordnung von PC2(717-792) im $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum auf die Titrationsbedingungen

Die Übertragung der Zuordnung für PC2(717-792) im  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum erfolgte anhand der Peakliste von Allen et al., PDB-Eintrag 2Y4Q (Allen et al., 2014). Die Zuordnung der Peaks ist in Abbildung 67 und Abbildung 68 dargestellt.



**Abbildung 67:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792)

Gezeigt wird die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792)-Signale. Messbedingungen: V = 500  $\mu\text{l}$ , 0.9 mM PC2(717-792), T = 298 K, pH 7.48, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Aufgenommen mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 128); NS 16. Datenprozessierung: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2). Q768-Signal nur auf tieferem Niveau erkennbar.

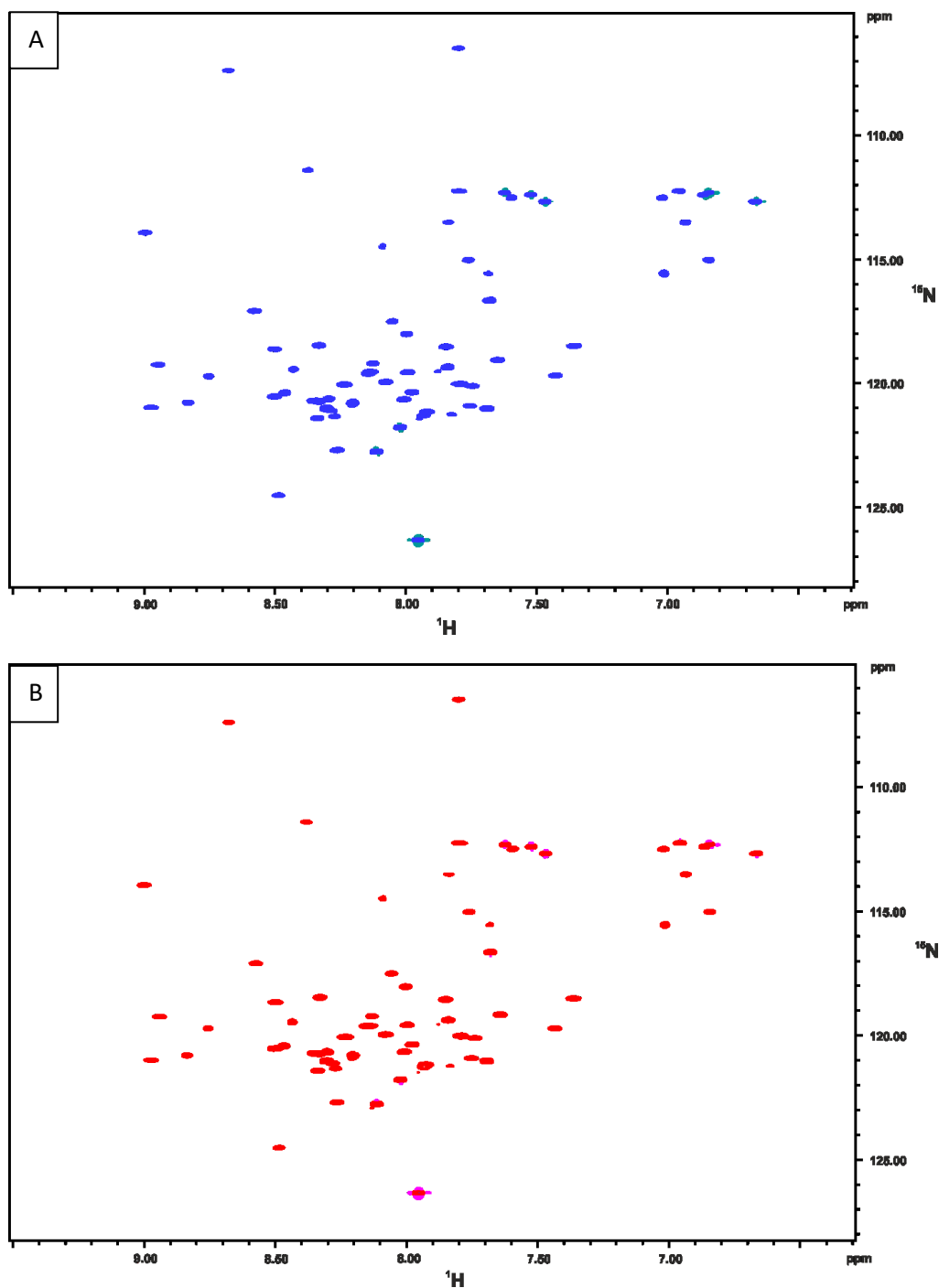


**Abbildung 68:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) vergrößerter Ausschnitt

Gezeigt wird die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792)-Signale im mittleren Bereich des Spektrums. Messbedingungen: V = 500  $\mu\text{l}$ , 0.9 mM PC2(717-792), T = 298 K, pH 7.48, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Aufgenommen mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 128); NS 16. Datenprozessierung: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).

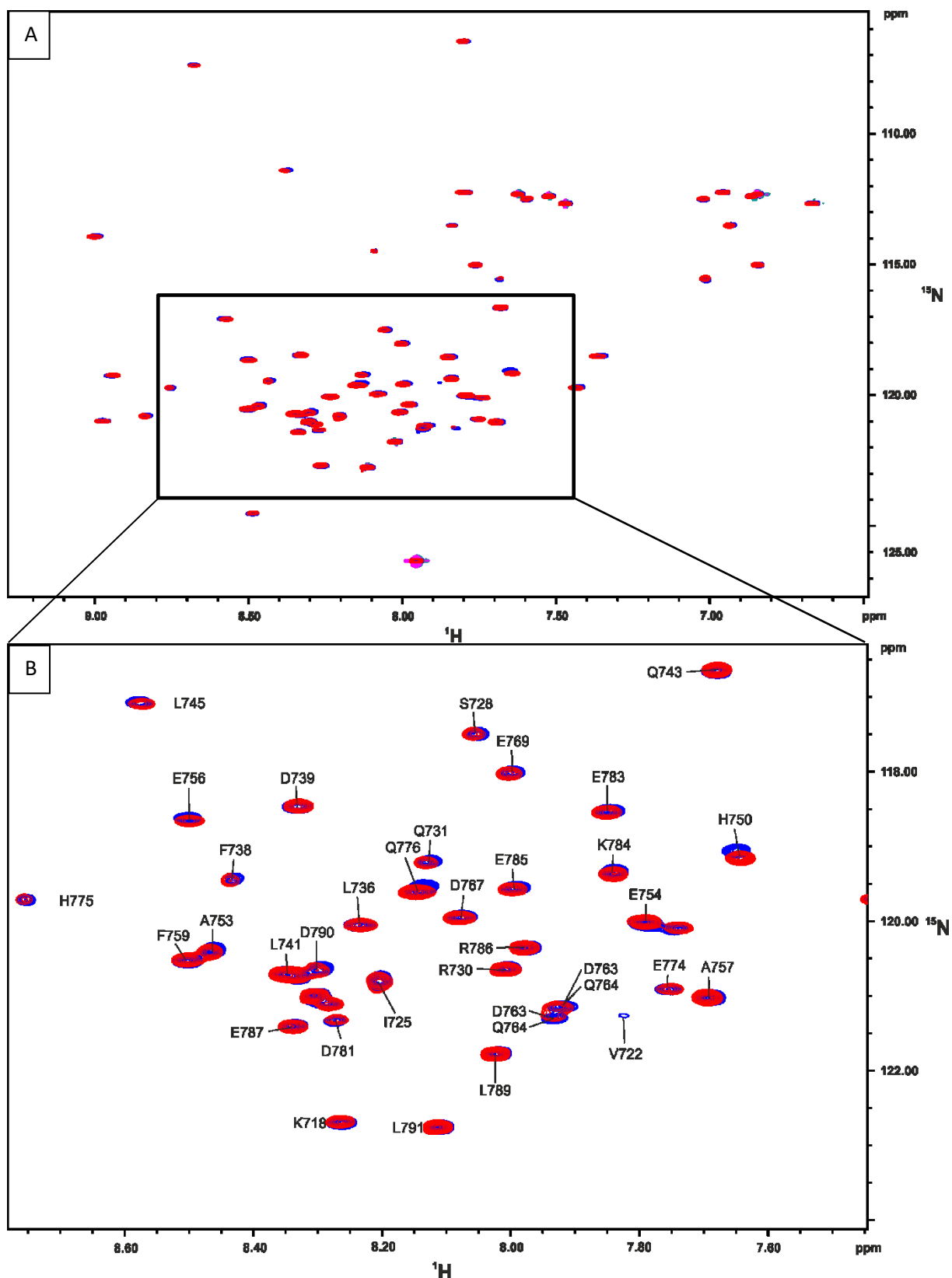
#### 4.3.2.2 Titration von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) mit dem Formin mDia1(69-451)

Für die Titration mit dem Formin mDia1(69-451) wurde die Konzentration von PC2(717-792) bei 60  $\mu\text{M}$  gewählt. Sie liegt damit im Bereich des von Eberhardt berechneten durchschnittlichen  $K_D$ -Wertes von  $39,3 \pm 13,7$   $\mu\text{M}$  für die Komplexbildung (Eberhardt, 2011). Eine geringere Konzentration hätte die Auswertung der Spektren stark erschwert. Im Verlauf der Titration wurde schrittweise mDia1(69-451) bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  (fünffacher molarer Überschuss) zugegeben. Die Durchführung und Auswertung der Titration erfolgte wie in 3.5.6 beschrieben. Ein 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum des Formins mDia1(69-451) wird in Abbildung 56 gezeigt. Abbildung 69 zeigt die  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -gelabeltem PC2(717-792) ohne und mit fünffachem Überschuss ungelabeltem mDia1(69-451) in der Probe. In Abbildung 70 sind die beiden Spektren überlagert dargestellt. Hier sind chemische Verschiebungsänderungen der Signale durch die Komplexbildung von PC2(717-792) mit mDia1(69-451) zu erkennen.



**Abbildung 69:**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von (A) freiem  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) [blau] und (B)  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) im Komplex mit mDia1(69-451) bei fünffachem Überschuss mDia1(69-451) [rot].

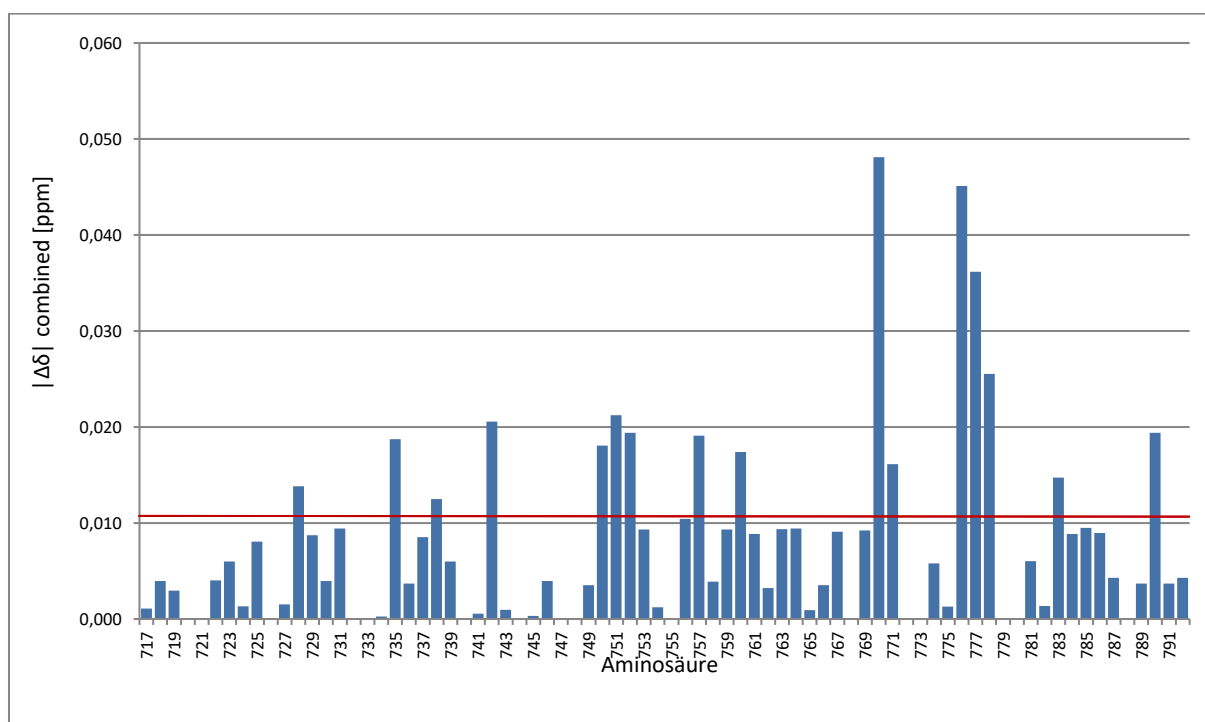
Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.48$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wurde mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).



**Abbildung 70:** (A) Überlagerung der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von freiem  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) [blau] und  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) im Komplex mit mDia1(69-451) bei fünffachem Überschuss mDia1(69-451) [rot]. (B) Vergrößerter Ausschnitt

Messbedingungen: V=500  $\mu\text{l}$ , 60  $\mu\text{M}$  PC2(717-792), T = 298K, pH 7.48, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 25  $\mu\text{M}$  AEBSF, 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wurde mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).

Es wurden die kombinierten chemischen Verschiebungen aus der  $^{15}\text{N}$ - und  $^1\text{H}$ -Dimension nach Schumann et al. sowie die Änderungen der Signalvolumina ausgewertet (Schumann, 2007). Abbildung 71 zeigt die kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im HSQC-Spektrum durch die PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Komplexbildung. Dargestellt ist der Betrag der chemischen Verschiebungsänderung für jede Aminosäure beim Verhältnis 1:5 im Vergleich zum Referenzspektrum ohne mDia1(69-451) in der Probe. Mit  $\sigma_0^{\text{kor}}$  wurde das Signifikanzkriterium nach Schumann et al. verwendet (Schumann, 2007). Alle Aminosäuren, die Änderungen in den Beträgen der chemischen Verschiebung größer als  $\sigma_0^{\text{kor}}$  aufwiesen, wurden als signifikant und in Bezug auf die PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Komplexbildung als relevant eingestuft.



**Abbildung 71: Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im HSQC-Spektrum durch die PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(717-792) zu mDia1(69-451)]**

Gezeigt werden die Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der PC2(717-792)-Signale durch die Zugabe von fünffach molarem Überschuss mDia1(69-451). Das korrigierte Signifikanzniveau  $\sigma_0^{\text{kor}}$  ist durch die rote Linie gekennzeichnet ( $\sigma_0^{\text{kor}} = 0,011$ ). Messbedingungen: V=500  $\mu\text{l}$ , 60  $\mu\text{M}$  PC2(717-792), T = 298K, pH 7.48, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , 25  $\mu\text{M}$  AEBSF, 50  $\mu\text{M}$  DSS, 5%  $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Auswertung der chemischen Verschiebungen: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).

Abbildung 72 zeigt die kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale von  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) in der Sequenz. Die Aminosäuren mit Änderungen oberhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$  sind rot markiert, blau steht für Änderungen unterhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$ . Grau markierte Aminosäuren weisen auf ein nicht zugeordnetes oder im Verlauf der Titration nicht verfolgbares Signal hin.



	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739
A	L	K	K	N	T	V	D	D	I	S	E	S	L	R	Q	G	G	G	K	L	N	F	D

	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762
A	E	L	R	Q	D	L	K	G	K	G	H	T	D	A	E	I	E	A	I	F	T	K	Y

	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785
A	D	Q	D	G	D	Q	E	L	T	E	H	E	H	Q	Q	M	R	D	D	L	E	K	E

	786	787	788	789	790	791	792
A	R	E	D	L	D	L	D

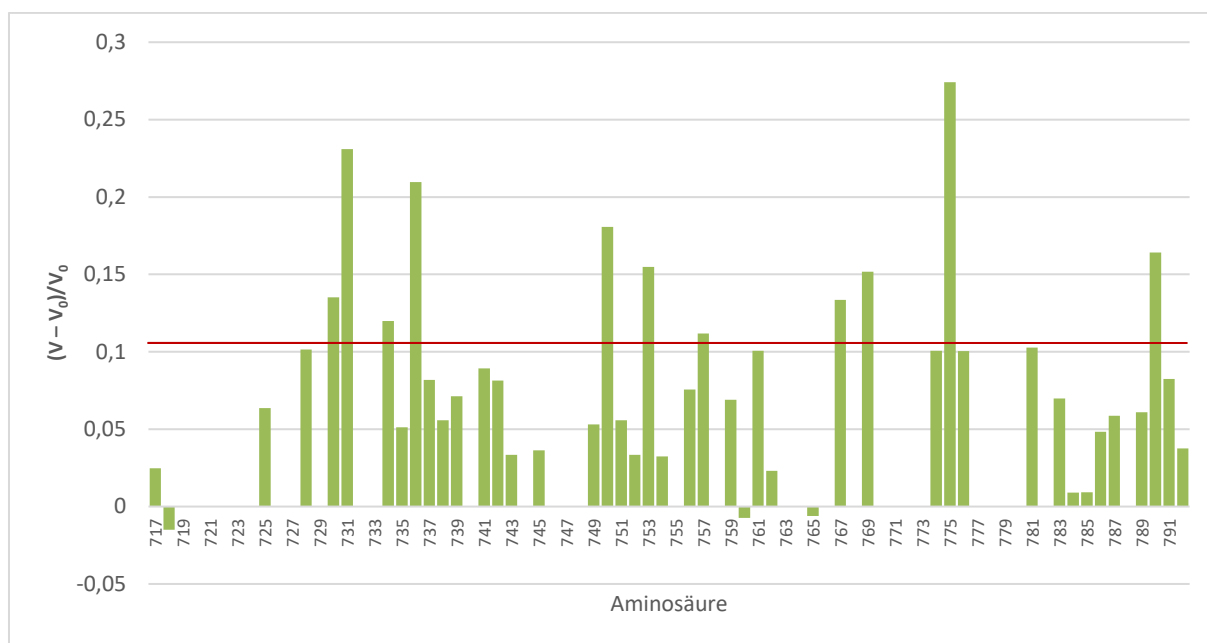
  

kombinierte chemische Verschiebungsänderungen

**Abbildung 72: Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale von  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im HSQC-Spektrum durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451)**

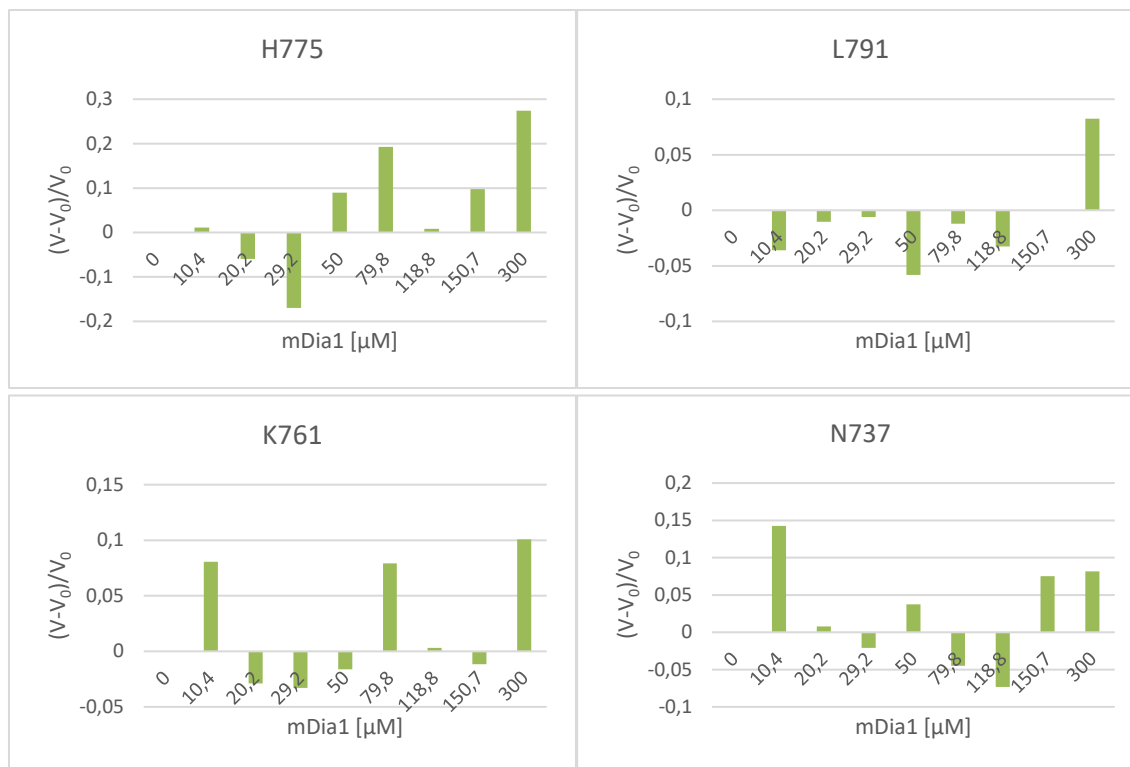
Die Aminosäuren mit Änderungen oberhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$  sind rot markiert. Blau steht für Änderungen unterhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$ . Grau bedeutet keine Zuordnung oder Signal im Verlauf der Titration nicht verfolgbar. In der Sequenz hellgrün eingezeichnet sind die beiden EF-Hände von PC2(717-792)

Abbildung 73 zeigt die Volumenänderungen der Signale der Aminosäuren des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im HSQC-Spektrum durch die PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 im Vergleich zum Referenzspektrum ohne mDia1(69-451) in der Probe. Erwartet wurde eine Volumenabnahme der Signale durch die Komplexbildung mit mDia1. Für die Mehrzahl der Signale wurde jedoch eine geringe Volumenzunahme beobachtet. Diese Änderungen liegen im mess- und auswertungsbedingten Schwankungsbereich der Volumen, wie Abbildung 74 anhand der Signale H775, L791, K761 und N737 dargelegt. Daher wird davon ausgegangen, dass keine echten Volumeneffekte vorliegen. Da eine Abnahme der Signalvolumina für eine stärkere Bindung spricht und hier nur Änderungen der chemischen Verschiebungen zu beobachten sind, muss von einer eher geringen Affinität von mDia1(69-451) für PC2(717-792) ausgegangen werden. Die mDia1(69-451)-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  im fünffachen Überschuss zu PC2(717-792) reicht nach diesen Ergebnissen nicht aus, um in einen Sättigungsbereich vorzudringen und eine Abnahme der Signalvolumina in den Spektren zu zeigen. Trotzdem können anhand der chemischen Verschiebungsänderungen schwache Bindungseffekte nachgewiesen werden. Diese Effekte wurden in Abbildung 75 auf die von Allen et al. publizierte 3D-Struktur von PC2(717-792) übertragen (Allen et al., 2014). Alle Aminosäuren einer kombinierten chemischen Verschiebungsänderung oberhalb des Signifikanzniveaus  $\sigma_0^{\text{kor}}$  sind rot eingezeichnet. Blau steht für Änderungen unterhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$ . Grau bedeutet keine Zuordnung oder Signal im Verlauf der Titration nicht verfolgbar.

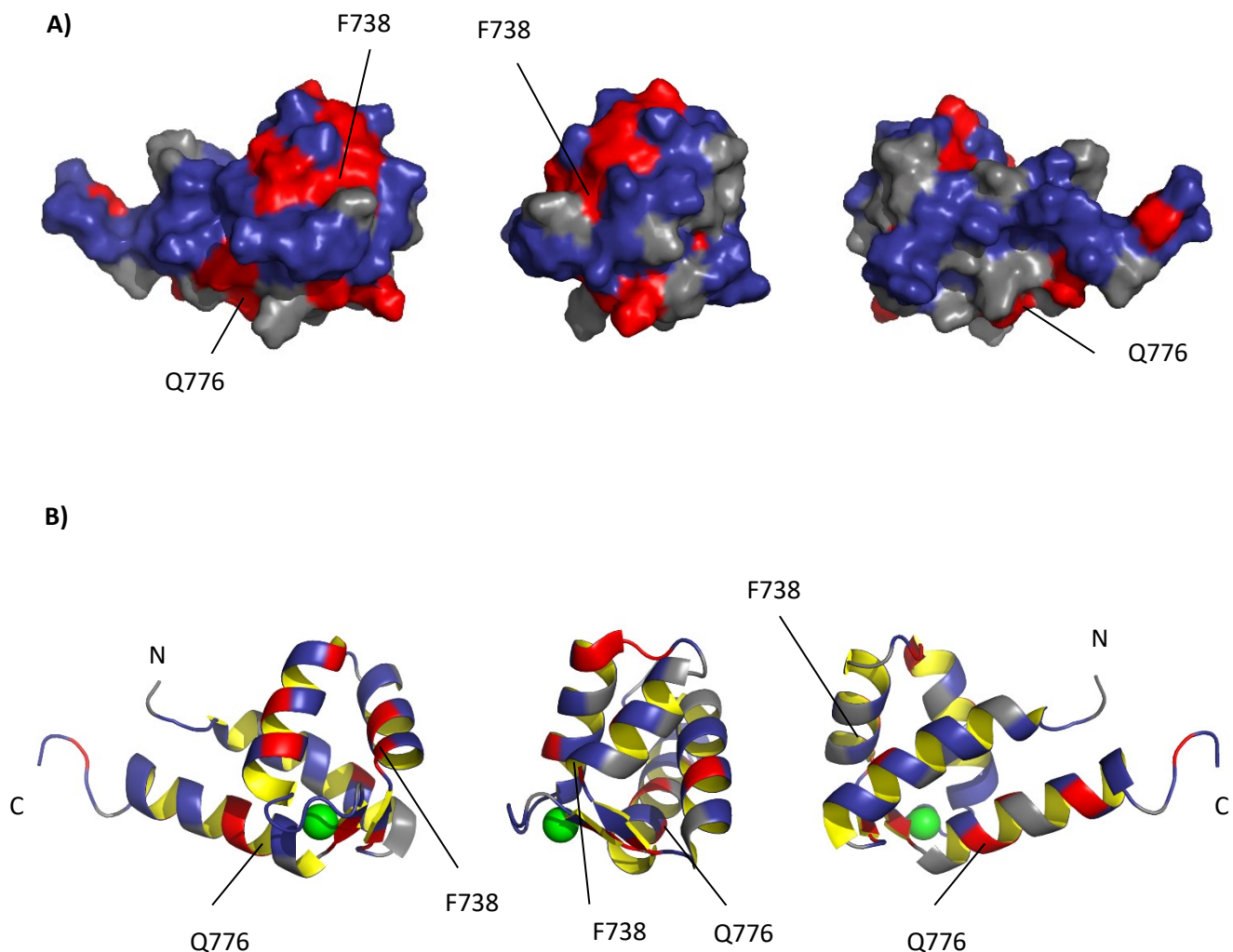


**Abbildung 73: Volumenänderungen der Signale des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im HSQC-Spektrum durch die PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(717-792) zu mDia1(69-451)]**

Gezeigt werden die Veränderungen der Signalvolumina  $(V - V_0)/V_0$  von PC2(717-792) in den HSQC-Spektren durch die Zugabe von fünffach molarem Überschuss mDia1(69-451). Das korrigierte Signifikanzniveau  $\bar{\sigma}_0^{\text{korr}}$  ist durch die rote Linie gekennzeichnet ( $\bar{\sigma}_0^{\text{korr}} = 0,11$ ). Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7,48$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Volumenauswertung: SI (F2: 2048, F1: 2048); EM-Filter mit LB (F2: 3, F1: 3).



**Abbildung 74: Schwankungen der Signalvolumina des  $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im Verlauf der Titration mit mDia1**  
Gezeigt werden die Schwankungen der Signalvolumina  $(V - V_0)/V_0$  bei verschiedenen mDia1-Konzentrationen anhand der Signale H775, L791, K761 und N737. Messbedingungen:  $V=500\ \mu\text{l}$ ,  $60\ \mu\text{M}$  PC2(717-792),  $T = 298\text{K}$ ,  $\text{pH } 7.48$ ,  $10\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0,5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Tris,  $150\ \text{mM}$  KCl,  $1\ \text{mM}$  DTT,  $1\ \text{mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $25\ \mu\text{M}$  AEBSF,  $50\ \mu\text{M}$  DSS,  $5\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von  $300\ \mu\text{M}$  zugegeben. Die Daten wurden mit einem  $800\ \text{MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Volumenauswertung: SI (F2: 2048, F1: 2048); EM-Filter mit LB (F2: 3, F1: 3).

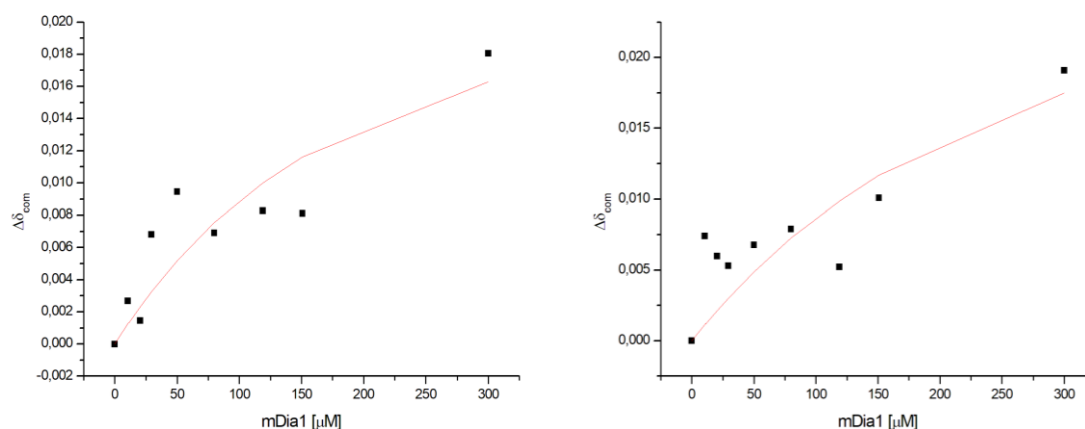


**Abbildung 75: Darstellung der Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale von PC2(717-792) durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) auf der 3D-Struktur von PC2(717-792), PDB-entry: 2Y4Q.**

Die Zunahme der Signalvolumina liegt innerhalb des Schwankungsbereichs und wird daher nicht auf der 3D-Struktur dargestellt. (A) Oberflächendarstellung: Die Aminosäuren mit Änderungen oberhalb von  $\Phi_0^{korr}$  sind rot markiert. Blau steht für Änderungen unterhalb von  $\Phi_0^{korr}$ . Grau bedeutet keine Zuordnung oder Signal im Verlauf der Titration nicht verfolgbar. (B) Cartoondarstellung von A. Das Kalziumion ist grün eingezeichnet.

Zur Errechnung des  $K_D$ -Werts für die Interaktion von PC2(717-792) mit mDia1(69-451) wurden kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen von H750 und A757 gegen die mDia1-Konzentration mit dem Programm Origin 6.0 geplottet und mit Formel 20 gefittet (Abbildung 76). Es ergeben sich  $K_D$ -Werte von  $147 \pm 169 \mu\text{M}$  für H750 und  $234 \pm 365 \mu\text{M}$  (Abbildung 77). Somit ergibt sich ein mittlerer Gesamt- $K_D$ -Wert von ca.  $191 \mu\text{M}$ . Die hohen Fehler bei den  $K_D$ -Werten sind darauf zurückzuführen, dass keine Messpunkte bei höheren mDia1-Konzentrationen vorhanden sind und

vermutlich noch kein Sättigungsbereich für die mDia1-Bindung im Verlauf der Titration erreicht wurde.



**Abbildung 76: Kombinierte chemische Verschiebungsänderungen von H750 (links) und A757 (rechts) im Verlauf der Titration mit mDia1**

Messbedingungen: V=500  $\mu$ l, 60  $\mu$ M PC2(717-792), T = 298K, pH 7.48, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 25  $\mu$ M AEBSF, 50  $\mu$ M DSS, 5% D<sub>2</sub>O. Im Verlauf der Titration wird mDia1(69-451) in Schritten bis zu einer Konzentration von 300  $\mu$ M zugegeben. Die Daten wurden mit einem 800 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 2048, F1: 512); NS 16. Datenprozessierung für Auswertung der chemischen Verschiebungen: SI (F2: 2048, F1: 2048); GM-Filter mit LB (F2: -8, F1: -8) und GB (F2: 0,1, F1: 0,2).

	<b>K<sub>D</sub> [<math>\mu</math>M]</b>
<b>H750</b>	147 $\pm$ 169
<b>A757</b>	234 $\pm$ 365

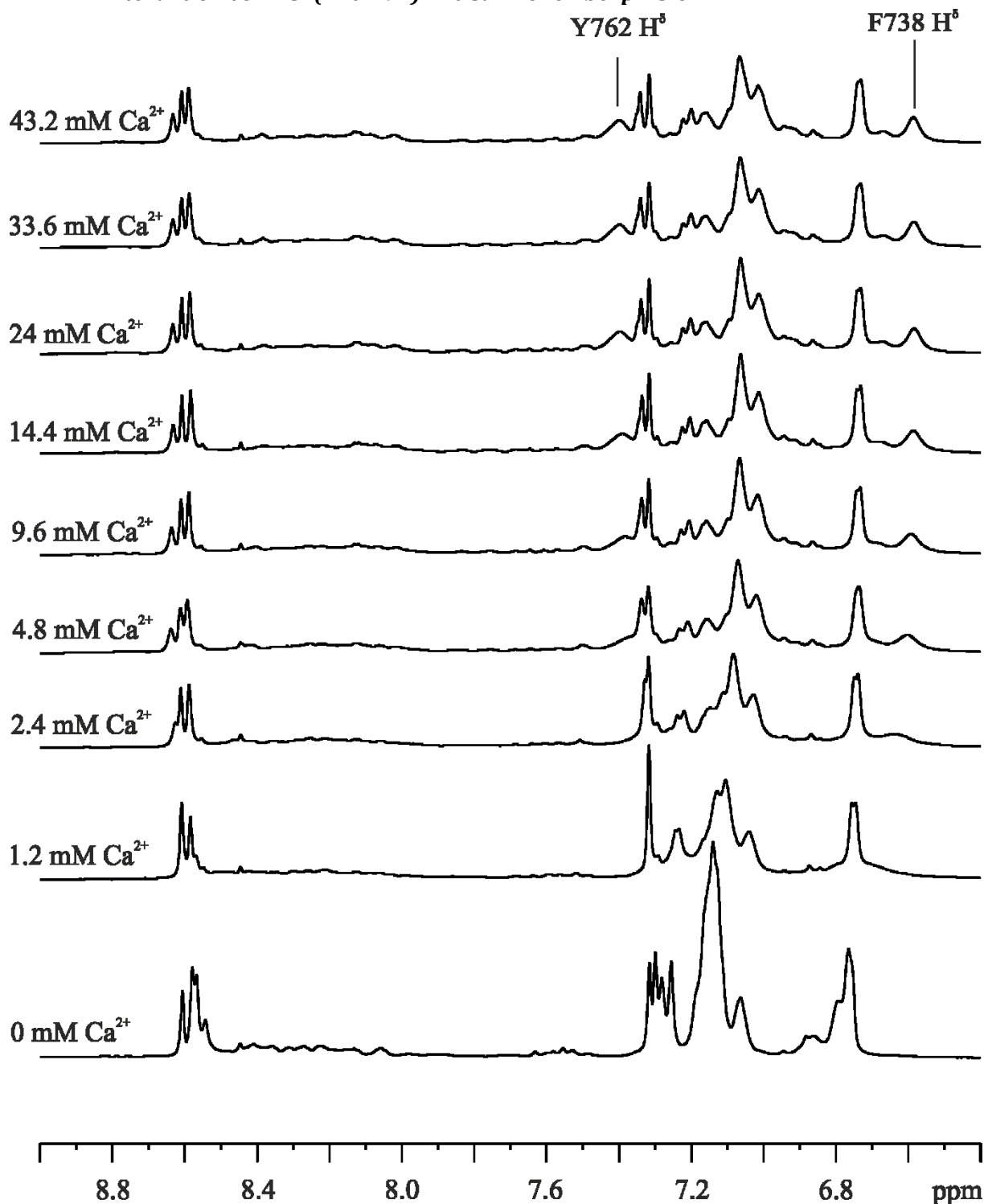
**Abbildung 77: K<sub>D</sub>-Werte für die Interaktion von PC2(717-792) mit mDia1(69-451)**

## 4.4 PC2(720-797)

### 4.4.1 Interaktion von PC2(720-797) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$

Petri et al. gehen wie davon aus, dass sich bei PC2(720-797) ein nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Helix-Loop-Helix-Motiv (Helices 1 und 2) an die kanonische EF-Hand (Helices 3 und 4) anlagert. Dieses nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Motiv hat sich nach Petri et al. aus einer kanonischen EF-Hand entwickelt, wie man sie bei PC2 von Wirbellosen findet (Petri et al., 2010). Für PC2(720-797) wurde von Ćelić et al. mittels ITC ein  $K_D$ -Wert von 214  $\mu\text{M}$  für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ermittelt, während sie bei PC2(704-968) eine viel höhere Affinität mit einem  $K_D = 12 \mu\text{M}$  beobachteten (Ćelić et al., 2008). Die Mutante T771A/E774A von PC2(704-968) kann kein  $\text{Ca}^{2+}$  binden. Für das Fragment PC2(720-797) wurden  $\text{CaCl}_2$ -Titrations bei pH 5.6 und 6.8 in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt. Die Durchführung der Titration und Auswertung der Spektren erfolgte wie in 3.5.4 beschrieben.

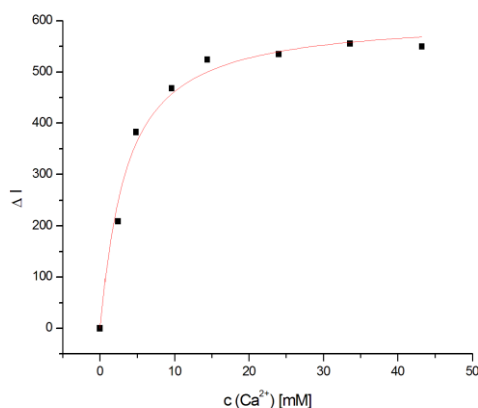
#### 4.4.1.1 Interaktion von PC2(720-797) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei pH 5.6



**Abbildung 78: 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von PC2(720-797) bei pH 5.6 und steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration**

Die Integrale der Signale F738 H $\delta$  und Y762 H $\delta$  nehmen mit steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration bis zu einem Sättigungswert zu. Messbedingungen: V = 600  $\mu\text{l}$ , 0.89 mM PC2(720-797), T = 298K, pH 5.6, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 50  $\mu\text{M}$  DSS, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , in 99.9%  $\text{D}_2\text{O}$ , 1 mM EDTA. Im Verlauf der Titration wird  $\text{CaCl}_2$  in Schritten bis zu einer Konzentration von 43.2 mM zugegeben. Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit LB = 2.00.

Es sind bei PC2(720-796) die beiden bereits von dem Fragment PC2(680-796) bekannten Markersignale für die Kalziumbindung F738 H<sup>δ</sup> und Y762 H<sup>δ</sup> zu sehen (Abbildung 78). Bei einer Kalziumkonzentration von 43,2 mM liegt das Signal von F738 H<sup>δ</sup> bei 6,58 ppm und das Signal von Y762 H<sup>δ</sup> bei 7,40 ppm. Für beide Aminosäuren ist bei pH 5.6 nur ein Zustand zu beobachten. Das Signal Y762 H<sup>δ</sup> verhält sich im Spektrum analog zu F738 H<sup>δ</sup>, konnte jedoch aufgrund der Signalüberlagerung nicht ausgewertet werden. Das Integral von F738 H<sup>δ</sup> wurde gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen und mit Formel 4 gefittet (Abbildung 79). Für PC2(720-797) ergibt sich bei pH 5,6 ein K<sub>D</sub>-Wert von 2,94 ± 0,49 mM für Kalziumionen.



**Abbildung 79: Integrale von F738 H<sup>δ</sup> gegen die CaCl<sub>2</sub>-Konzentration aufgetragen und mit Formel 4 gefittet**

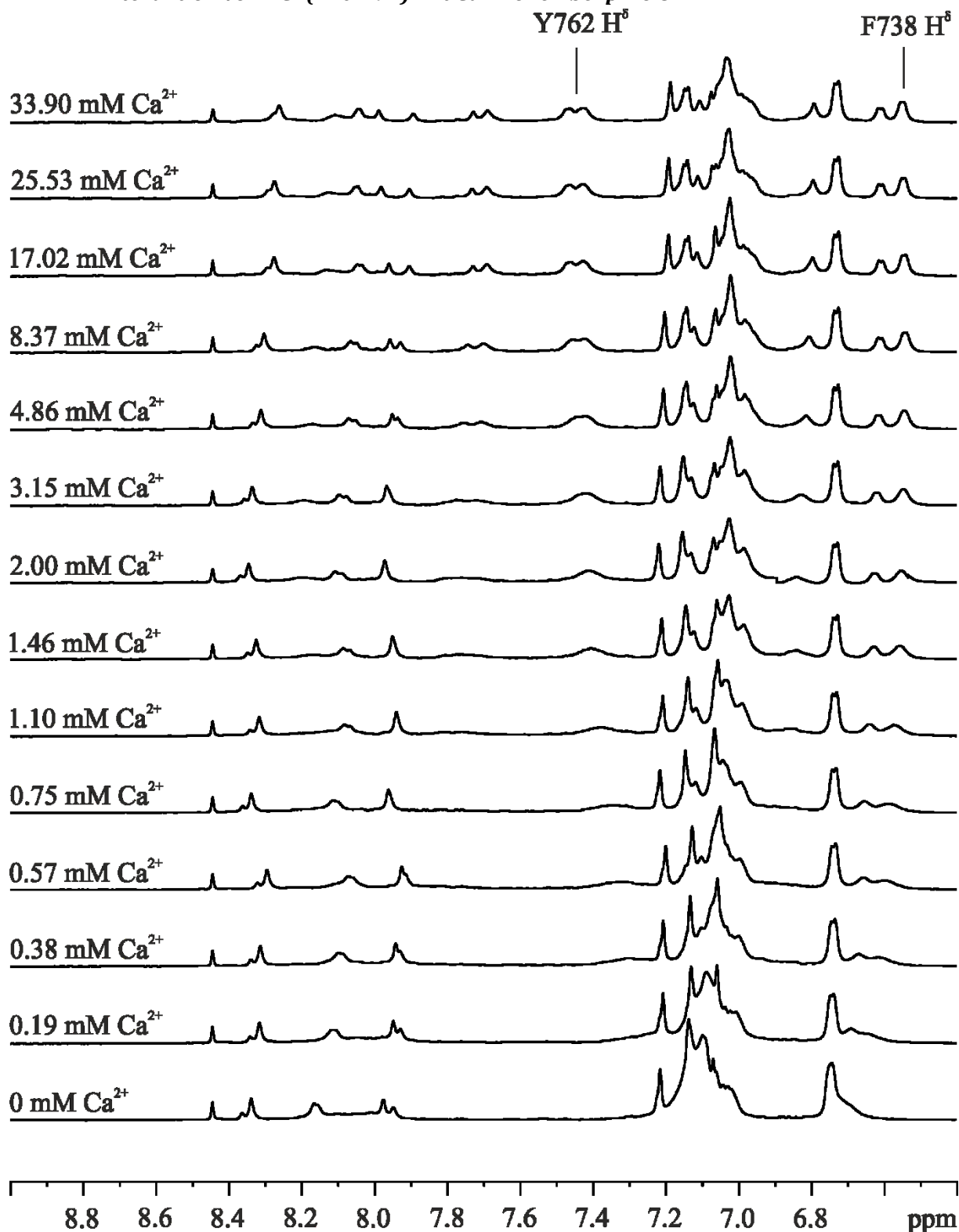
Messbedingungen: V = 600 µl, 0.89 mM PC2(720-797), T = 298K, pH 5.6, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 50 µM DSS, 1 mM NaN<sub>3</sub>, in 99.9% D<sub>2</sub>O, 1 mM EDTA. Im Verlauf der Titration wird CaCl<sub>2</sub> in Schritten bis zu einer Konzentration von 43.2 mM zugegeben.

	K <sub>D</sub> -Wert [mM]
<b>F738 H<sup>δ</sup></b>	2,94 ± 0,49

**Tabelle 33: K<sub>D</sub>-Wert von PC2(720-797) für Ca<sup>2+</sup>-Ionen bei pH 5,6**



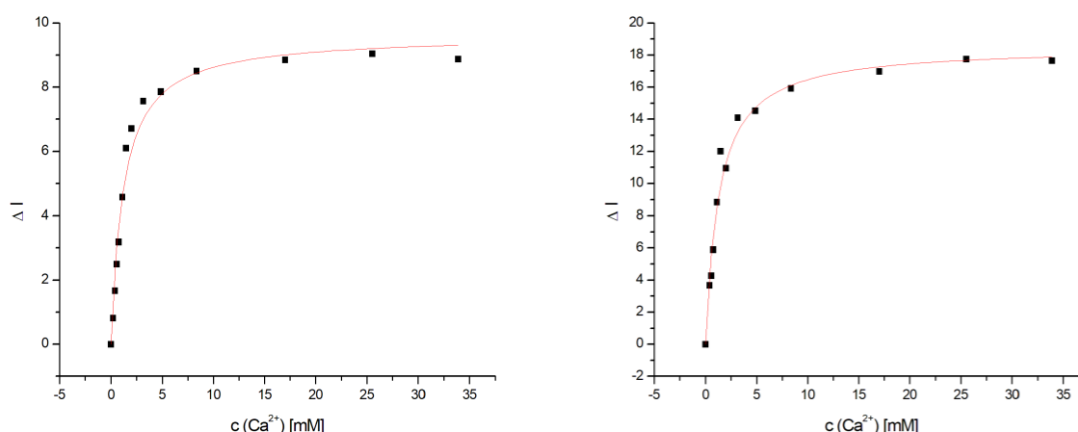
#### 4.4.1.2 Interaktion von PC2(720-797) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei pH 6.8



**Abbildung 80: 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von PC2(720-797) bei pH 6.8 und steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration**

Die Integrale der Signale F738  $\text{H}^\delta$  und Y762  $\text{H}^\delta$  nehmen mit steigender  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration bis zu einem Sättigungswert zu. Messbedingungen:  $V = 600 \mu\text{l}$ ,  $46 \mu\text{M}$  PC2(720-797),  $T = 298\text{K}$ , pH 6.8, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 100  $\mu\text{M}$  DSS, 99.9%  $\text{D}_2\text{O}$ . Im Verlauf der Titration wird  $\text{CaCl}_2$  in Schritten bis zu einer Konzentration von 33.9 mM zugegeben. Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit LB = 2.00.

In Abbildung 81 wurden die Integrale von F738 H<sup>δ</sup> und Y762 H<sup>δ</sup> gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen und mit Formel 4 die K<sub>D</sub>-Werte für die Interaktion von PC2(720-797) bei pH 6.8 mit Kalzium bestimmt. Es ergeben sich die K<sub>D</sub>-Werte 1,16 ± 0,14 mM F738 H<sup>δ</sup> und 1,26 ± 0,15 mM für Y762 H<sup>δ</sup> (Tabelle 34). Y762 H<sup>δ</sup> weist in Ansätzen zwei Zustände A (rechter Peak) und B (linker Peak) auf, deren Integral zusammen bei maximaler Kalziumkonzentration in etwa doppelt so groß wie das Integral von F738 H<sup>δ</sup> ist (Tabelle 35). Tabelle 36 zeigt das Verhältnis der Populationen von H<sup>δ</sup> Y762/A und B bei 33.9 mM CaCl<sub>2</sub> in der Probe.



**Abbildung 81: Integrale von F738 H<sup>δ</sup> (links) und Y762 H<sup>δ</sup> (rechts) gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen und mit Formel 4 gefittet**

Messbedingungen: V = 600 µl, 46 µM PC2(720-797), T = 298K, pH 6.8, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 100 µM DSS, 99.9% D<sub>2</sub>O. Im Verlauf der Titration wird CaCl<sub>2</sub> in Schritten bis zu einer Konzentration von 33.9 mM zugegeben.

	K <sub>D</sub> -Werte [mM]
<b>F738 H<sup>δ</sup></b>	1,16 ± 0,14
<b>Y762 H<sup>δ</sup></b>	1,26 ± 0,15

**Tabelle 34: K<sub>D</sub>-Werte von PC2(720-797) für Ca<sup>2+</sup>-Ionen bei pH 6.8**

	Maximalintegrale bei 33.9 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>F738 H<sup>δ</sup></b>	8822601
<b>Y762 H<sup>δ</sup></b>	17555617

**Tabelle 35: Integrale der Aminosäuren F738 H<sup>δ</sup> und Y762 H<sup>δ</sup> bei 33.9 mM CaCl<sub>2</sub> in der Probe**

Y762 H<sup>δ</sup> weist in Ansätzen zwei Zustände A und B auf, deren Integral zusammen in etwa doppelt so groß wie das Integral von F738 H<sup>δ</sup> ist.

H <sup>δ</sup> Y762/A	H <sup>δ</sup> Y762/B
54 %	46 %

**Tabelle 36: Verhältnis der Populationen von H<sup>δ</sup> Y762/A und B bei 33.9 mM CaCl<sub>2</sub>**

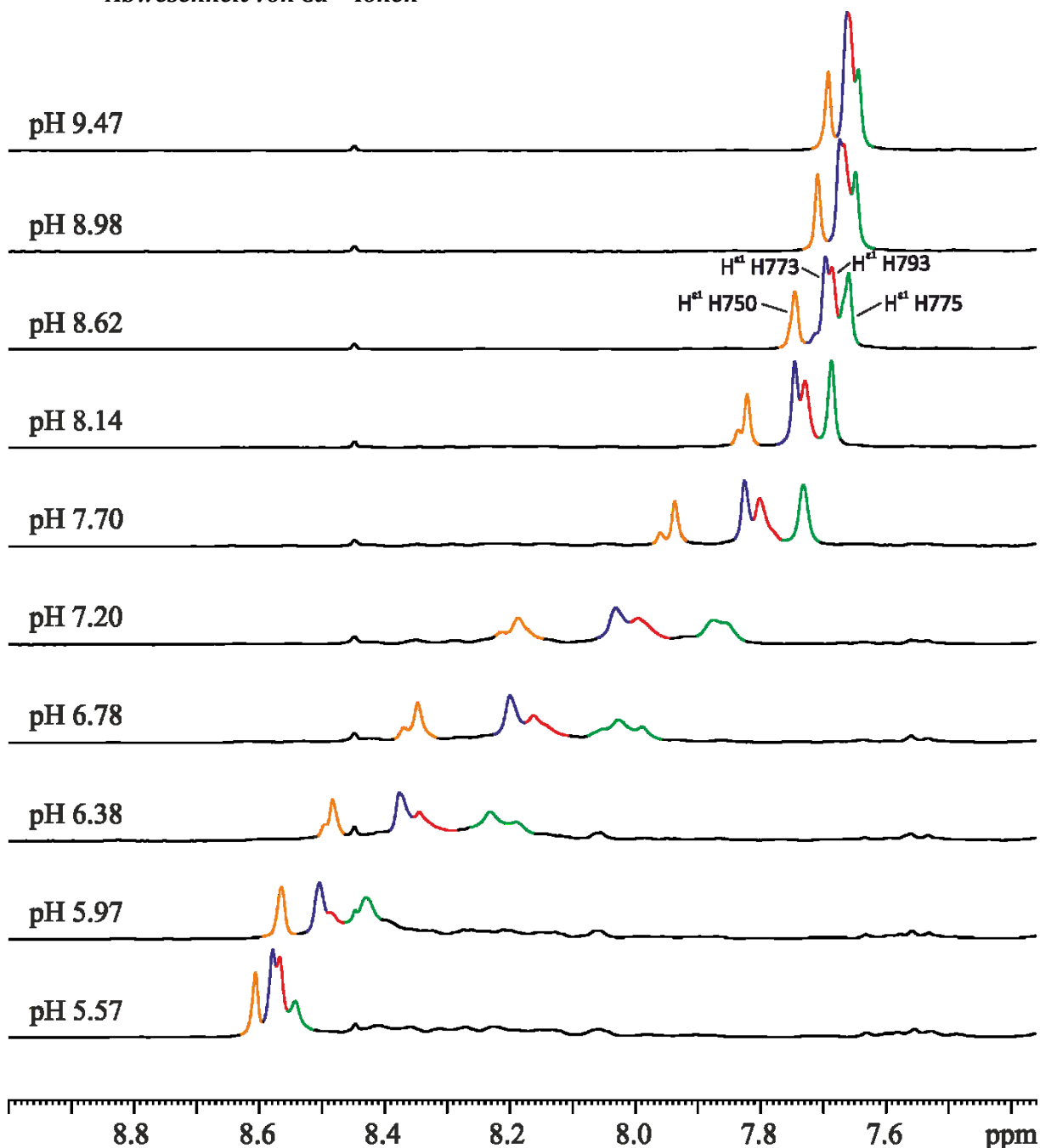
Gezeigt wird das Verhältnis der Populationen von H<sup>δ</sup> Y762/A und B bei 33.9 mM CaCl<sub>2</sub>. Erst bei hohen Kalziumkonzentrationen konnten die Zustände Y762 H<sup>δ</sup>/A + B getrennt integriert werden.

#### 4.4.2 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(720-797)

Zur Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(720-797) wurden pH-Titrationen wie in 3.5.3 beschrieben durchgeführt. PC2(720-797) enthält vier Histidine. Die Zuordnung der H<sup>ε1</sup>-

Signale der vier Histidine H750, H773, H793, H775 erfolgte anhand der Zuordnung des Aromatenbereichs von Eberhardt für das längere Fragment PC2(680-796) (Eberhardt, 2011). Die Säurekonstanten von Histidinen in Proteinen geben Einblick in ihre chemische Umgebung und Funktion (Tanokura, 1983).

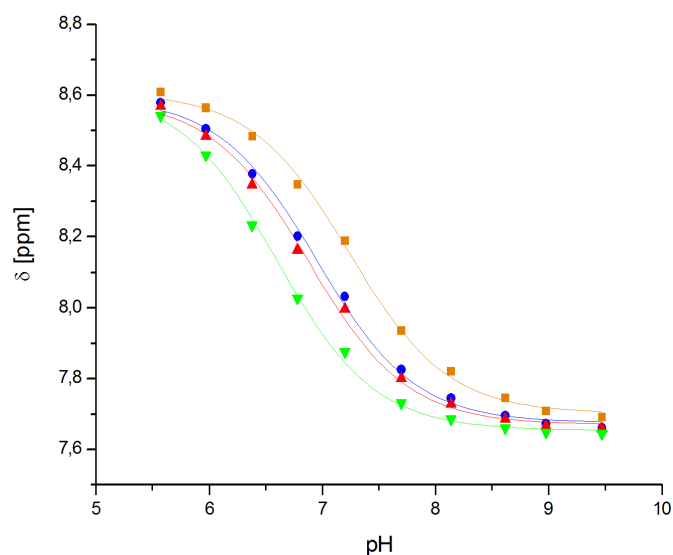
#### 4.4.2.1 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(720-797) in Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen



**Abbildung 82:** 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von PC2(720-797) in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Probe: Die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine shiften mit steigendem pH

$\text{H}^{\epsilon 1}$  H750 [orange],  $\text{H}^{\epsilon 1}$  H773 [blau],  $\text{H}^{\epsilon 1}$  H793 [rot],  $\text{H}^{\epsilon 1}$  H775 [grün]. Messbedingungen:  $V = 600 \mu\text{l}$ ,  $0.89 \text{ mM}$  PC2(720-797),  $T = 298 \text{ K}$ ,  $20 \text{ mM}$  Tris,  $150 \text{ mM}$  KCl,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  DTT,  $50 \mu\text{M}$  DSS,  $1 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $99.9\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem  $600 \text{ MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit  $\text{LB} = 2.00$ .

Es wurde eine pH-Titration für PC2(720-797) in Abwesenheit von Kalziumionen durchgeführt. In den Spektren aus Abbildung 82 ist zu erkennen, wie die die  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine mit steigendem pH shiften. Die ppm-Werte der vier Signale  $H^{\epsilon 1}$  H750,  $H^{\epsilon 1}$  H773,  $H^{\epsilon 1}$  H793 und  $H^{\epsilon 1}$  H775 wurden in Abbildung 83 gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet.  $H^{\epsilon 1}$  H750 und  $H^{\epsilon 1}$  H775 zeigen beide Nebenpeaks bei niedrigem pH. Ausgewertet wurde jeweils der Hauptpeak. In Tabelle 37 sind die berechneten pK-Werte aufgeführt.  $H^{\epsilon 1}$  H750 zeigt mit  $7.24 \pm 0.03$  den höchsten,  $H^{\epsilon 1}$  H775 mit  $6.59 \pm 0.04$  den niedrigsten pK-Wert.



**Abbildung 83:  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine von PC2(720-797) in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Ionen gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet**

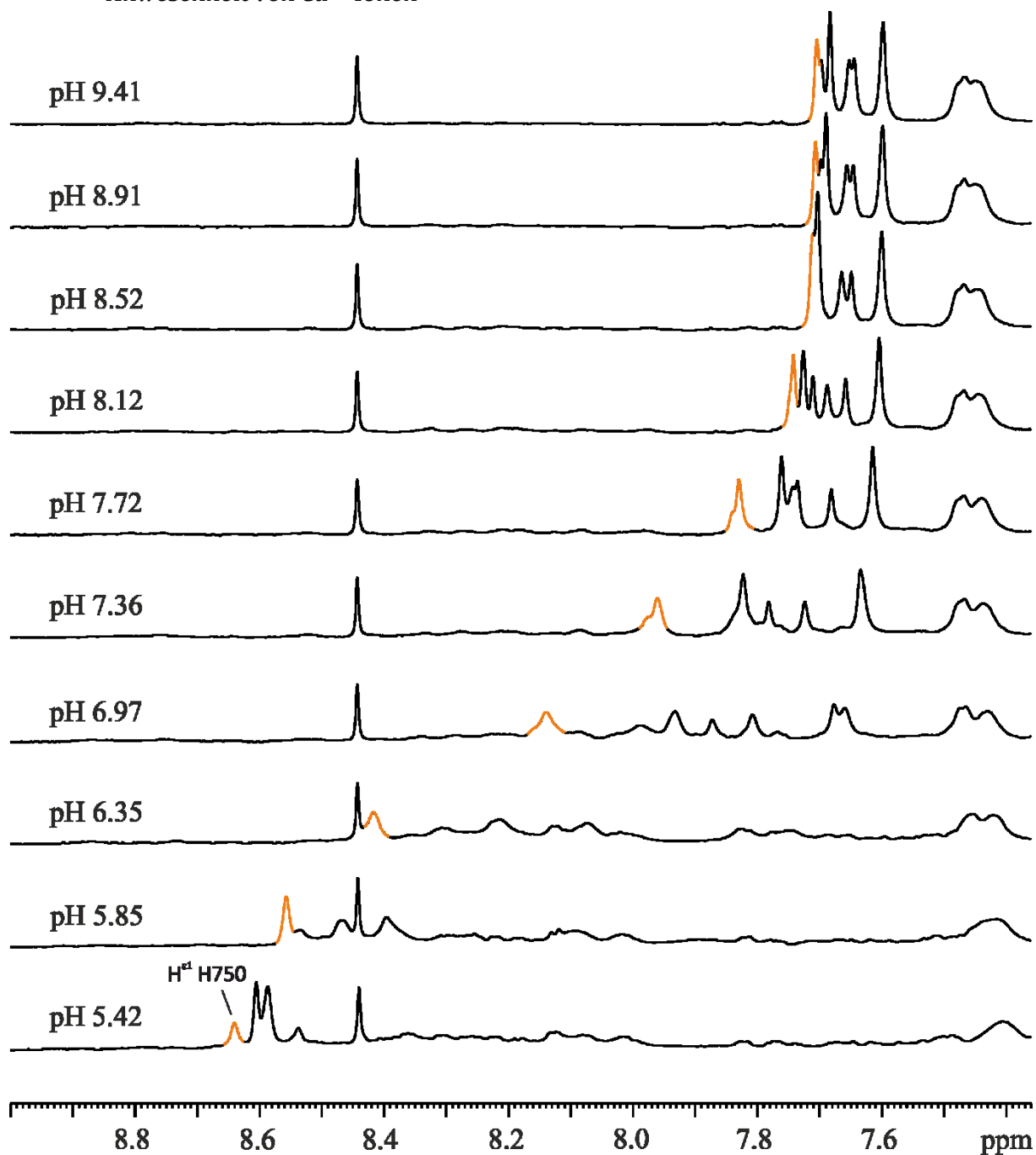
$H^{\epsilon 1}$  H750 [orange],  $H^{\epsilon 1}$  H773 [blau],  $H^{\epsilon 1}$  H793 [rot],  $H^{\epsilon 1}$  H775 [grün]. Messbedingungen:  $V = 600 \mu\text{l}$ ,  $0.89 \text{ mM}$  PC2(720-797),  $T = 298\text{K}$ ,  $20 \text{ mM}$  Tris,  $150 \text{ mM}$  KCl,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  DTT,  $50 \mu\text{M}$  DSS,  $1 \text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $99.9\%$   $\text{D}_2\text{O}$ .

	$H^{\epsilon 1}$ H750	$H^{\epsilon 1}$ H773	$H^{\epsilon 1}$ H793	$H^{\epsilon 1}$ H775
<b>pK-Wert</b>	$7.24 \pm 0.03$	$6.95 \pm 0.03$	$6.88 \pm 0.04$	$6.59 \pm 0.04$
<b><math>\Delta\delta</math></b>	$0.91 \pm 0.02$	$0.91 \pm 0.03$	$0.92 \pm 0.03$	$0.97 \pm 0.03$
<b><math>\delta_{\text{HA}}</math></b>	$8.61 \pm 0.01$	$8.59 \pm 0.02$	$8.59 \pm 0.02$	$8.62 \pm 0.02$
<b><math>\delta_{\text{A}^-}</math></b>	$7.70 \pm 0.01$	$7.68 \pm 0.01$	$7.67 \pm 0.01$	$7.65 \pm 0.01$

**Tabelle 37: pK-Werte der Histidine von PC2(720-797) in Abwesenheit von  $Ca^{2+}$ -Ionen**

Die Daten wurden mit Formel 2 gefittet.  $\delta_{\text{HA}}$  chemische Verschiebung der vollprotonierten Form,  $\delta_{\text{A}^-}$  chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form,  $\Delta\delta$  Differenz  $\delta_{\text{HA}} - \delta_{\text{A}^-}$ .

#### 4.4.2.2 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(720-797) in Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

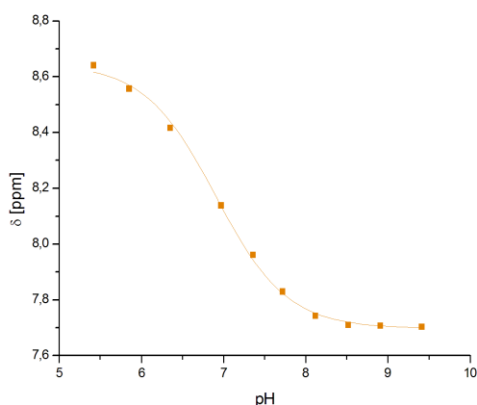


**Abbildung 84: 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von PC2(720-797) in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in der Probe: Die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine shiften mit steigendem pH**

Messbedingungen:  $V = 660 \mu\text{l}$ ,  $133 \mu\text{M}$  PC2(720-797),  $T = 298\text{K}$ ,  $20 \text{ mM}$  Tris,  $150 \text{ mM}$  KCl,  $39.9 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $1 \text{ mM}$  EDTA,  $1 \text{ mM}$  DTT,  $200 \mu\text{M}$  DSS,  $99.9\%$   $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem  $600 \text{ MHz}$  Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD: 32768; NS 128. Datenprozessierung: SI: 65536; EM-Filter mit  $\text{LB} = 2.00$ .

Es wurde außerdem eine pH-Titration für PC2(720-797) in Anwesenheit von Kalziumionen durchgeführt (Abbildung 84). Dabei konnte nur das H750  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signal eindeutig zugeordnet werden. Die Histidine scheinen in mehreren Zuständen vorzuliegen, da deutlich mehr als vier  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale bei vier Histidinen von PC2(720-797) vorhanden sind. Es zeigen sich zudem deutliche Unterschiede in den Integralen der im Spektrum sichtbaren Peaks. Die chemischen Verschiebungen von H750  $\text{H}^{\epsilon 1}$

wurden gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet (Abbildung 85). Es ergibt sich für H<sup>ε1</sup> H750 ein pK-Wert von  $6.90 \pm 0.03$ .



**Abbildung 85: H750 H<sup>ε1</sup> von PC2(720-797) in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet**

Messbedingungen: V = 600 μl, 0.89 mM PC2(720-797), T = 298K, 20 mM Tris, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 μM DSS, 1 mM NaN<sub>3</sub>, 99.9% D<sub>2</sub>O.

	H <sup>ε1</sup> H750
pK-Wert	$6.90 \pm 0.03$
Δδ	$0.95 \pm 0.02$
δ <sub>HA</sub>	$8.65 \pm 0.01$
δ <sub>A-</sub>	$7.70 \pm 0.01$

**Tabelle 38: pK-Wert des Histidins H<sup>ε1</sup> H750 von PC2(720-797) in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> - Ionen**

Die Daten wurden mit Formel 2 gefittet. δ<sub>HA</sub> chemische Verschiebung der vollprotonierten Form, δ<sub>A-</sub> chemische Verschiebung der vollständig deprotonierten Form, Δδ Differenz δ<sub>HA</sub> - δ<sub>A-</sub>.

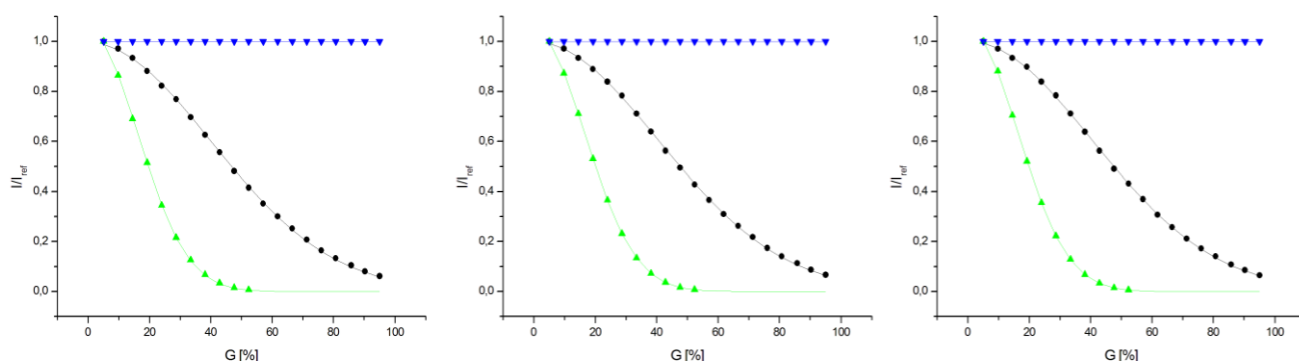
#### 4.4.3 Aggregationszustand von PC2(720-797)

PC2(720-797) kann in Lösung umgebungsabhängig in verschiedenen polymeren Zuständen vorliegen. Im Folgenden wird bestimmt, ob der Polymerzustand von PC2(720-797) von der Kalziumkonzentration und dem pH-Wert abhängt. Hierfür werden 1D-NMR-Diffusionsmessungen durchgeführt. Die mittels *Protparam* anhand der Sequenz errechnete theoretische Molekülmasse ergibt für das Monomer von PC2(720-797) inklusive zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen einen Wert von 10.738 kD. Celic et al. ermittelten mittels analytischer Ultrazentrifugation ein Monomer für PC2(720-797) (Ćelić et al., 2008).

##### 4.4.3.1 Aggregatzustand von PC2(720-797) in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen

Um aus der Aufreinigung eventuell noch vorhandenes Restkalzium zu entfernen, wurde der Probe vor den Messungen 1 mM EDTA zugegeben. Dann wurden für die pH-Bedingungen 5.0, 7.8 und 9.0 Diffusionsmessungen mit dem Pulsprogramm *diffu-oneshot* durchgeführt. Die Diffusionsmessungen zeigen bei Referenzierung auf DSS in allen drei pH-Bereichen ohne CaCl<sub>2</sub> in der Probe ein Tetramer an. Abbildung 86 zeigt den Signalabfall von PC2(720-797) und der Referenz DSS als Funktion der

relativen Gradientenstärke und Tabelle 39 stellt die experimentell ermittelten scheinbaren Molekülmassen sowie die relativen hydrodynamischen Radii dar. Die Gradientenstabilität wurde mittels PAA bestätigt.



**Abbildung 86. Aggregationszustand von PC2(720-797) bei pH 5.6 (links), pH 7.8 (mitte) und pH 9.0 (rechts) in Abwesenheit von Kalzium**

Graph von  $I/I_{\text{ref}}$  als Funktion der relativen Gradientenstärke  $G$ , wobei  $I$  die Signalintensität beim Gradienten  $G$  und  $I_{\text{ref}}$  die Signalintensität beim niedrigsten Gradienten angibt. Als Referenz wurde DSS benutzt. Polyacrylamid (90% $\text{H}_2\text{O}$ , 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) wurde im Vorfeld der Messungen benutzt, um die Stabilität des Gradientensystems zu überprüfen. Gezeigt wird der Signalabfall von PAA (blau), PC2(720-797) (schwarz), und DSS (grün). Messbedingungen:  $V = 660 \mu\text{l}$ ,  $187 \mu\text{M}$  PC2(720-797), pH 5.6 (links), pH 7.8 (mitte), pH 9.0 (rechts),  $T = 298\text{K}$ ,  $1 \text{ mM EDTA}$ ,  $20 \text{ mM Tris}$ ,  $150 \text{ mM KCl}$ ,  $1 \text{ mM DTT}$ ,  $100 \mu\text{M DSS}$ , 99.9%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 32768, F1: 20); NS 64. Datenprozessierung: SI (F2: 32768, F1: 20); EM-Filter mit LB = 2.

Probe	$R_h^a$	$M_{\text{exp}}^b$ $g \cdot \text{mol}^{-1}$	$M_{\text{calc}}^c$ $g \cdot \text{mol}^{-1}$
PC2(720-797), pH 5.6	$2,143 \pm 0,046$	$46,647 \pm 1,364$	10,658
PC2(720-797), pH 7.8	$2,111 \pm 0,043$	$44,565 \pm 1,175$	10,658
PC2(720-797), pH 9.0	$2,109 \pm 0,040$	$44,495 \pm 1,013$	10,658

**Tabelle 39: Scheinbare Molekülmassen und relative hydrodynamische Radii von PC2(720-797) in Abwesenheit  $\text{CaCl}_2$  bei verschiedenen pH-Werten**

Messbedingungen:  $V = 660 \mu\text{l}$ ,  $187 \mu\text{M}$  PC2(720-797),  $T = 298\text{K}$ ,  $1 \text{ mM EDTA}$ ,  $20 \text{ mM Tris}$ ,  $150 \text{ mM KCl}$ ,  $1 \text{ mM DTT}$ ,  $100 \mu\text{M DSS}$ , 99.9%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 32768, F1: 20); NS 64. Datenprozessierung: SI (F2: 32768, F1: 20); EM-Filter mit LB = 2.

<sup>a</sup> Berechnete relative hydrodynamische Radii von PC2(720-797). Es wurde der von Wierschem für DSS experimentell ermittelte hydrodynamische Radius von  $0,346 \pm 0,004 \text{ nm}$  zur Berechnung der relativen hydrodynamischen Radii von PC2(720-797) verwendet (Wierschem, 2013)

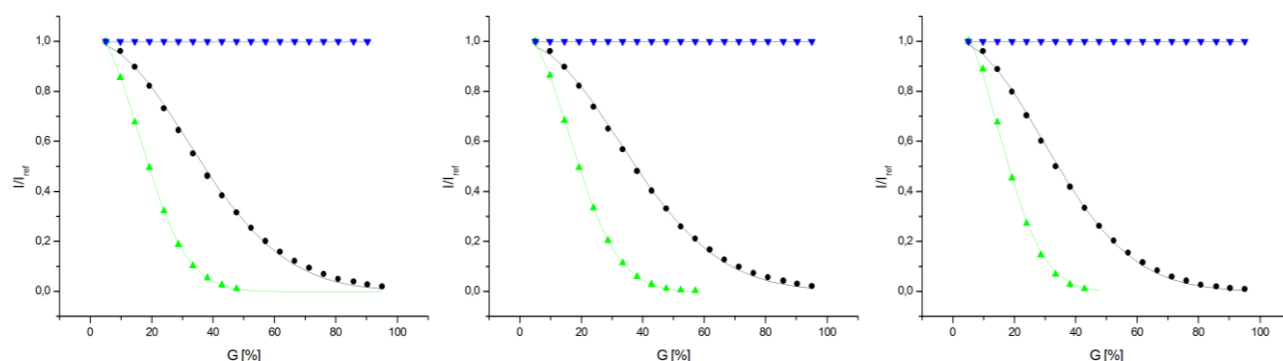
<sup>b</sup> experimentell ermittelte scheinbare Molekülmasse von PC2(720-797) in der Probe mit DSS ( $196,34 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) als Referenz

<sup>c</sup> auf Basis der Sequenz berechnete Molekülmasse eines Monomers von PC2(720-797)

#### 4.4.3.2 Aggregatzustand von PC2(720-797) in Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen

Um eine Sättigung von PC2(720-797) mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen unter allen pH-Bedingungen zu gewährleisten, wurden  $39.9 \text{ mM CaCl}_2$  zugegeben. Im Anschluss daran wurden wieder für die pH-Werte 5.0, 7.8 und 9.0 Diffusionsmessungen mit dem Pulsprogramm *diffu-oneshot* durchgeführt. Die Diffusionsmessungen zeigen für alle drei pH-Werte bei Sättigung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ein Monomer an. Abbildung 87 zeigt den Signalabfall von PC2(720-797) und der Referenz DSS als Funktion der relativen

Gradientenstärke und Tabelle 40 stellt die experimentell ermittelten scheinbaren Molekülmassen sowie die relativen hydrodynamischen Radii dar. Die Gradientenstabilität wurde mittels PAA bestätigt.



**Abbildung 87. Aggregationszustand von PC2(720-797) bei pH 5.6 (links), pH 7.8 (mitte) und pH 9.0 (rechts) in Anwesenheit von Kalzium**

Graph von  $I/I_{\text{ref}}$  als Funktion der relativen Gradientenstärke  $G$ , wobei  $I$  die Signalintensität beim Gradienten  $G$  und  $I_{\text{ref}}$  die Signalintensität beim niedrigsten Gradienten angibt. Als Referenz wurde DSS benutzt. Polyacrylamid (90% $\text{H}_2\text{O}$ , 10% $\text{D}_2\text{O}$ ) wurde im Vorfeld der Messungen benutzt, um die Stabilität des Gradientensystems zu überprüfen. Gezeigt wird der Signalabfall von PAA (blau), PC2(720-797) (schwarz), und DSS (grün). Messbedingungen:  $V = 660 \mu\text{l}$ ,  $133 \mu\text{M}$  PC2(720-797), pH 5.6 (links), pH 7.8 (mitte) und pH 9.0 (rechts),  $T = 298\text{K}$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 39.9 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200  $\mu\text{M}$  DSS, 99.9%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 32768, F1: 20); NS 64. Datenprozessierung: SI (F2: 32768, F1: 20); EM-Filter mit  $\text{LB} = 2$ .

Probe	$R_h^a$	$M_{\text{exp}}^b$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_{\text{calc}}^c$ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
PC2(720-797)* $2\text{Ca}^{2+}$ , pH 5.6	$1,432 \pm 0,052$	$13932 \pm 1038$	10,738
PC2(720-797)* $2\text{Ca}^{2+}$ , pH 7.8	$1,442 \pm 0,051$	$14203 \pm 1027$	10,738
PC2(720-797)* $2\text{Ca}^{2+}$ , pH 9.0	$1,390 \pm 0,049$	$12726 \pm 896$	10,738

**Tabelle 40: Scheinbare Molekülmassen und relative hydrodynamische Radii von PC2(720-797) in Anwesenheit  $\text{CaCl}_2$  bei verschiedenen pH-Werten.**

Messbedingungen:  $V = 660 \mu\text{l}$ ,  $133 \mu\text{M}$  PC2(720-797),  $T = 298\text{K}$ , 20 mM Tris, 150 mM KCl, 39.9 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200  $\mu\text{M}$  DSS, 99.9%  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Daten wurden mit einem 600 MHz Bruker NMR-Spektrometer aufgenommen. Datenaquisition: TD (F2: 32768, F1: 20); NS 64. Datenprozessierung: SI (F2: 32768, F1: 20); EM-Filter mit  $\text{LB} = 2$ .

<sup>a</sup> Berechnete relative hydrodynamische Radii von PC2(720-797). Es wurde der von Wierschem für DSS experimentell ermittelte hydrodynamische Radius von  $0,346 \pm 0,004 \text{ nm}$  zur Berechnung der relativen hydrodynamischen Radii von PC2(720-797) verwendet (Wierschem, 2013)

<sup>b</sup> experimentell ermittelte scheinbare Molekülmasse von PC2(720-797) in der Probe mit DSS ( $196,34 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) als Referenz

<sup>c</sup> auf Basis der Sequenz berechnete Molekülmasse eines Monomers von PC2(720-797) inklusive zwei Kalziumionen

Die Diffusionsmessungen zeigen an, dass PC2(720-797) in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bei allen drei pH-Werten als Tetramer vorliegt. Mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen gesättigtes PC2(720-797) scheint hingegen in allen pH-Bereichen als Monomer vorzuliegen (Tabelle 41). Für das Fragment PC2(720-797) besteht somit eine Abhängigkeit des Aggregatzustandes von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Eine pH-Abhängigkeit des Aggregatzustandes liegt nicht vor.



pH	Ca <sup>2+</sup>	Polymer
5.6	Nein	Tetramer
7.8	Nein	Tetramer
9.0	Nein	Tetramer
5.6	Ja	Monomer
7.8	Ja	Monomer
9.0	Ja	Monomer

**Tabelle 41: Polymerzustand von PC2(720-797) in An- und Abwesenheit Kalziumionen bei verschiedenen pH-Werten.**

## 5 Diskussion

### 5.1 PC2(680-796)

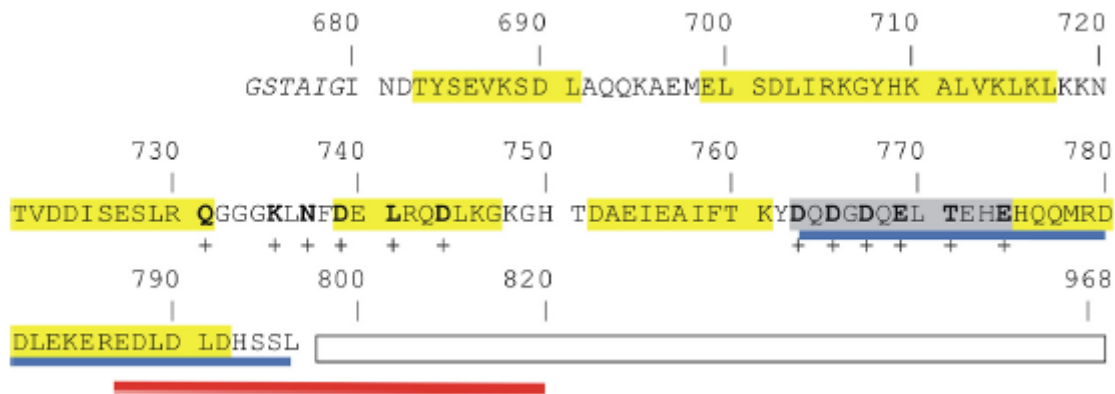
#### 5.1.1 Der Aromatenbereich von PC2(680-796): Identifizierung verschiedener Zustände

Mittels  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY- und  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren konnte bestätigt werden, dass Y762  $\text{H}^\delta$  in zwei Zuständen vorliegt, da im  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY Crosspeaks zu den bereits von Eberhardt als Y762/A  $\text{H}^\epsilon$  und Y762/B  $\text{H}^\epsilon$  zugeordneten Signalen vorhanden sind. Bereits Eberhardt zeigte zwei Zustände dieses Signals im  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -TOCSY, konnte diese jedoch aufgrund der Überlagerung im 1D-NOESY nicht getrennt beobachten. Dies war unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen möglich, so dass ein Verhältnis von 0,27 Y762/B  $\text{H}^\delta$  zu 0,73 Y762/A  $\text{H}^\delta$  ermittelt werden konnte, das wahrscheinlich die Populationsverhältnisse von PC2 in zwei Zuständen A und B widerspiegelt.

#### 5.1.2 Interaktion von PC2(680-796) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$ und Aggregatzustand

Es gibt eine große Anzahl von  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen mit vielfältigen Funktionen, die als EF-Hand-Protein-Superfamilie zusammengefasst werden. Sie alle enthalten ein EF-Hand-Motiv mit einer Helix-Loop-Helix-Struktur, die verantwortlich für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung ist. Bei vielen Mitgliedern der Superfamilie induziert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung eine Konformationsänderung im EF-Hand-Motiv, was wiederum zu einer Aktivierung oder Inaktivierung von Zielproteinen führen kann, wie es z. B. bei Calmodulin oder Troponin C der Fall ist (Yap et al., 1999). Auch für den zytosolischen C-Terminus von PC2 wurde eine Konformationsänderung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung beobachtet (Allen et al., 2014; Petri et al., 2010; Schumann et al., 2009a). CD-Messungen von Ćelić et al. zeigten ebenso wie Messungen von Eberhardt und Allen et al. eine  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Konformationsänderung für C-terminales PC2 (Allen et al., 2014; Ćelić et al., 2008; Eberhardt, 2011). Eberhardt konnte messen, dass sich der  $\alpha$ -Helix-Anteil bei Zugabe von 2 mM Kalzium von 30 auf 47% erhöht (Eberhardt, 2011). Petri et al. konnten ebenso eine kalziumabhängige Konformationsänderung mittels CD-Spektroskopie nachweisen, wobei sich der  $\alpha$ -Helix-Anteil durch Kalziumzugabe von 27 auf 45% erhöht. Ohne Kalzium liegt C-terminales PC2 größtenteils ungefaltet vor (Petri et al., 2010).

In Abbildung 88 ist C-terminales PC2 mit den vorhergesagten strukturellen Bereichen dargestellt. Es wurden zwei EF-Hände für die Bereiche AS 727-739 (atypische EF-Hand 1) bzw. AS 763-774 (kanonische EF-Hand 2) ermittelt (Mochizuki et al., 1996; Schumann et al., 2009a). Jedoch postulieren sowohl Allen et al. als auch Petri et al., dass die atypische EF-Hand 1 mit der kanonischen EF-Hand 2 zwar interagiert und mit ihr eine gemeinsame Struktur ausbildet, jedoch kein  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann (Allen et al., 2014; Ćelić et al., 2008). Petri et al. gehen davon aus, dass sich bei PC2(720-797) ein nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Helix-Loop-Helix-Motiv (Helices 1 und 2) an die kanonische EF-Hand (Helices 3 und 4) anlagert. Dieses nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Motiv hat sich nach Petri et al. aus einer kanonischen EF-Hand entwickelt, wie man sie bei PC2 von Wirbellosen findet (Petri et al., 2010a). Auch Allen et al. gehen für das Fragment PC2(717-792) von nur einer  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden EF-Hand aus. Sie ermittelten durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), dass PC2(717-792) ein einzelnes  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion mit einer Affinität von  $122 \pm 5.2 \mu\text{M}$  bindet. Die Mutante Q768G bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit einer zehnfach erhöhten Affinität von  $12 \pm 0.2 \mu\text{M}$  (Allen et al., 2014).



**Abbildung 88: C-Terminus von Polycystin-2**

Dargestellt ist das Fragment mit den Aminosäuren 680-796. Kursiv: Aminosäuren der Thrombinschnittstelle. Grau: Vorhergesagte kanonische EF-Hand (AS 763-774). In fett und mit (+) gekennzeichnet: Aminosäuren für die Interaktion mit dem Kalziumion vorhergesagt wird. Vorhergesagte Helices in gelb. Für die Aminosäuren EHE aus der kanonischen EF-Hand (grau) wurde ebenfalls eine helikale Struktur vorhergesagt. Für den Bereich AS 727-739 wird eine zweite EF-Hand vermutet. Aminosäuren mit starker Linienverbreiterung bei NMR-Messungen mit Mangan und daher Nähe zum Bindungsplatz des Metallions sind mit (+) gekennzeichnet. Blau: Vorhergesagte coiled-Coil-Region. Rot: Vorhergesagtes ER-Retentionssignal (Schumann et al., 2009a).

Schumann et al postulieren eine kanonische (AS 763-774) und eine atypische EF-Hand (AS 727-739) für das längere Fragment PC2(680-796) mit den Bindungskonstanten 55  $\mu\text{M}$  für die kanonische und 179  $\mu\text{M}$  für die atypische EF-Hand (Schumann et al., 2009a). Für PC2(720-797) wurde von Ćelić et al. mittels ITC ein  $K_D$ -Wert von 214  $\mu\text{M}$  für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ermittelt, während sie bei PC2(704-968) eine viel höhere Affinität beobachteten ( $K_D = 12 \mu\text{M}$ ). Aufgrund der höheren Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen beim längeren Fragment gehen Ćelić et al. davon aus, dass Regionen außerhalb der Aminosäuren 720-797 für die Stabilisierung der Kalziumbindungsstelle notwendig sind (Ćelić et al., 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei den kürzeren Fragmenten die atypische EF-Hand 1 (AS 727-739) aufgrund des fehlenden N-terminalen Bereichs nicht mehr korrekt ausgebildet wird. Von Schumann wurden wie in Abbildung 88 in gelb zu sehen N-terminale  $\alpha$ -helikale Bereiche für AS 683-692 und 699-717 vorhergesagt (Schumann et al., 2009a). Diese sind möglicherweise essentiell für die Funktionsfähigkeit der atypischen EF-Hand 1.

Die bisher durchgeführten Experimente am längeren Fragment PC2(680-796) wurden alle mit  $\text{H}_2\text{O}$  im Puffer durchgeführt. Aufgrund dessen war im Spektrum eine Überlagerung der Protonen der Aromaten durch die Amidprotonensignale vorhanden. Um dies zu verhindern, wurde ungelabeltes PC2 wie in 3.5.2 beschrieben lyophilisiert und ein  $\text{D}_2\text{O}$ -Austausch durchgeführt. Dies hatte zur Folge, dass die Signale der Tyrosine, Phenylalanine und Histidine im Aromatenbereich frei von Überlagerungen verfolgt werden konnten. Dadurch wurde ein umfassenderes Bild der kalziuminduzierten Prozesse bei PC2(680-796) gewonnen. Um eine Kalziumsättigung gewährleisten zu können, wurde die Titration bis in sehr hohe Kalziumkonzentrationsbereiche von ca. 16 mM durchgeführt und als Kontrolle sogar ein Spektrum bei ca. 50 mM aufgenommen, wobei sich vom 16 mM- zum 50 mM-Schritt keine spektralen Veränderungen im Aromatenbereich mehr zeigen. Für die Kalziumtitration konnte anhand des Tris-Signals die pH-Stabilität während der gesamten Titration bestätigt werden, wodurch ein pH-Effekt ausgeschlossen wird und damit alle im Spektrum sichtbaren Änderungen ausschließlich auf die Kalziumzugabe zurückgeführt werden können. Wie schon aus den Zuordnungsexperimenten bekannt, zeigen sich auch bei der Kalziumtitration für verschiedene Aminosäuren mehrere Zustände. Ihre jeweiligen Populationen wurden über ihre Integrale durch

Referenzierung auf das  $H^{\epsilon}$ -Signal von Y684 ermittelt. Y684 wurde bereits von Eberhardt als Referenzsignal zur Ermittlung der Populationen verwendet, da es auf Grund seiner Lage am N-Terminus des Fragments PC2(680-796) den Einfluss der Kalziumbindung am wenigsten spüren sollte (Eberhardt, 2011). Die  $H^{\delta}$ - und  $H^{\epsilon}$ -Signale der Aminosäure Y762, für die jeweils Zustand A und B vorhanden ist, zeigen bei Kalziumsättigung Populationen von 0,60 bzw. 0,61 für einen Zustand A und 0,41 bzw. 0,42 für einen Zustand B an. Die  $H^{\delta}$ -Signale von Y762 nehmen bei Kalziumzugabe bis zu ihrer Maximalpopulation (0,60 Zustand A; 0,41 Zustand B) zu, wobei Y762/B  $H^{\delta}$  ( $K_D = 17 \pm 4 \mu M$ ) eine weit höhere Affinität für Kalzium zeigt als Y762/A  $H^{\delta}$  ( $K_D = 738 \pm 99 \mu M$ ). Ohne Kalzium in der Probe sind die  $H^{\delta}$ -Signale von Y762 nicht sichtbar. Die  $H^{\epsilon}$ -Signale von Y762 sind erstaunlicherweise bereits ohne Kalzium in der Probe sichtbar und scheinen mit und ohne Kalzium in der Probe konstant das 60 : 40-Verhältnis zu zeigen. Für F738 konnte nur das  $H^{\delta}$ -Signal ausgewertet werden. Das  $H^{\epsilon}$ -Signal ist im Spektrum durch andere Signale überlagert. Da F738  $H^{\delta}$  bei Kalziumsättigung eine Maximalpopulation von 0,39 aufweist wird es Zustand B zugerechnet. Ein zweiter Zustand von F738  $H^{\delta}$  konnte im Spektrum nicht ermittelt werden. Die Integrale von F738/B  $H^{\delta}$  ( $K_D = 19 \pm 4 \mu M$ ) und Y762/B  $H^{\delta}$  ( $K_D = 17 \pm 4 \mu M$ ) verhalten sich bei Kalziumzugabe annähernd identisch und bilden den gleichen Prozess ab. F759  $H^{\delta}$  scheint bereits ohne Kalzium in der Probe die Maximalpopulation von ca. 0,6 zu zeigen, die dann über den gesamten Verlauf der Titration konstant bleibt. Aufgrund seiner Population wird es Zustand A zugerechnet. F759/A  $H^{\delta}$  zeigt bei Kalziumzugabe deutliche Änderungen seiner chemischen Verschiebung und weist einen  $K_D = 205 \pm 25 \mu M$  auf. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Tyrosin- bzw. Phenylalaninsignalen, die eindeutig zugeordnet werden konnten, gestaltete sich die Zuordnung der Histidinsignale schwieriger. Alle Histidine scheinen in zwei Zuständen vorzuliegen, ein Histidin evtl. sogar in drei Zuständen. Die Zuordnung der  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der fünf Histidine wurde nach Eberhardt gemäß ihrer Reihenfolge des Auftretens im 1D-NOESY-Spektrum übertragen, wobei zwei Zustände eines Histidinsignals aufgrund ihrer Nähe im Spektrum und der sich zu einem Proton ergänzenden Integrale einem Histidin zugeordnet wurden (Eberhardt, 2011). Dies stellt keine zu 100 % sichere, sondern nur die wahrscheinlichste Zuordnung dar. Die  $H^{\epsilon 1}$ -Signale von H750, H773, H709 und H775 weisen über den Titrationsverlauf zwei Zustände mit Populationsverhältnissen im Bereich von ca. 60 : 40 bis 50 : 50 auf, wobei zumeist ein Zustand stärker populiert ist und damit das schon beobachtete 60 : 40-Verhältnis untermauert wird. Das als H793 zugeordnete Histidin liegt wahrscheinlich sogar in drei Zuständen vor. Eine weitere Besonderheit stellt H775  $H^{\epsilon 1}$ -Signal dar, dessen Zustand A bei abnehmenden Kalziumkonzentrationen stark verbreitert und Richtung Tieffeld shiftet. Das Signal konnte aufgrund von Überlagerungen im Verlauf der Titration nicht quantitativ ausgewertet werden, zeigt jedoch rein optisch im Spektrum Ähnlichkeiten zum Verhalten des Y762/A  $H^{\delta}$ -Signals. Zustand B von H775  $H^{\epsilon 1}$  war ebenfalls nicht auszuwerten, bildet aber möglicherweise den gleichen Prozess wie das Y762/B  $H^{\delta}$ -Signal ab. Dies würde durchaus Sinn machen, da sich die Aromaten (bzw. beim Histidin der Imidazolring) von Y762 und H775 in der von Allen et al. publizierten 3D-Struktur relativ nahe sind (Abbildung 89). Im Wesentlichen scheint die Auswertung der Histidine die bereits an den Tyrosin- und Phenylalaninsignalen gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen. Die anhand der Histidinsignale ermittelten  $K_D$ -Werte bestätigen relativ gut bereits für die Tyrosin- und Phenylalaninsignale berechnete Werte. Es wurden insgesamt sieben Signale im Spektrum identifiziert, anhand derer  $K_D$ -Werte für die kalziumabhängige Prozesse bestimmt werden konnten. Diese sieben  $K_D$ -Werte konnten in drei Gruppen von  $K_D$ -Werten eingeteilt werden, die Tabelle 42 dargestellt sind. Gruppe 1 enthält drei  $K_D$ -Werte für Kalzium im Bereich von 17-30  $\mu M$ . Gruppe 2 enthält ebenso drei  $K_D$ -Werte im Bereich von 188-259  $\mu M$ . Für Gruppe 3 konnte nur ein Signal ausgewertet werden, jedoch scheint

auch das nicht eindeutig auswertbare Signal H775/A H<sup>ε1</sup> diesen Prozess abzubilden, so dass von insgesamt drei Prozessen im Verlauf der Kalziumtitration ausgegangen werden kann.

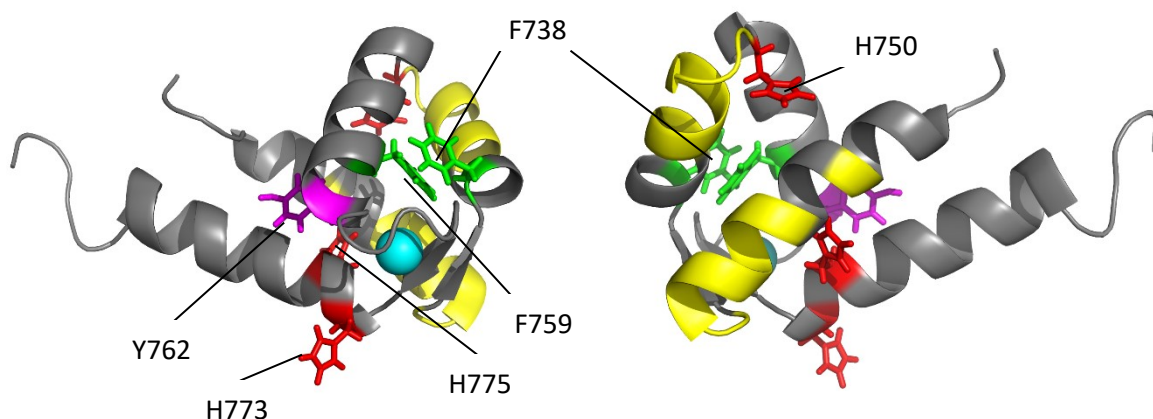
		K <sub>D</sub> -Wert [μM]
<b>Gruppe 1</b>	F738/B H <sup>δ</sup>	19 ± 4
	Y762/B H <sup>δ</sup>	17 ± 4
	H775/B H <sup>ε1</sup>	30 ± 5
<b>Gruppe 2</b>	F759/A H <sup>δ</sup>	205 ± 25
	H773/A H <sup>ε1</sup>	188 ± 30
	H793/B H <sup>ε1</sup>	259 ± 60
<b>Gruppe 3</b>	Y762/A H <sup>δ</sup>	738 ± 99

Tabelle 42: Gruppen der K<sub>D</sub>-Werte: Berechnung der K<sub>D</sub>-Werte von PC2(680-796) für Ca<sup>2+</sup>-Ionen

BP	AS	K <sub>D</sub> -Wert [μM]
1	F738/B H <sup>δ</sup>	10 ± 2
2	F759/A H <sup>δ</sup>	137 ± 18
3	Y762/A H <sup>δ</sup>	612 ± 72

Tabelle 43: Berechnung der K<sub>D</sub>-Werte von PC2(680-796) für Ca<sup>2+</sup>-Ionen mit dem Modell für 3 Bindungsplätze

Auffällig ist, dass sich in Gruppe 1 nur als Zustand B zugeordnete Signale befinden. In Gruppe zwei befinden sich analog dazu möglicherweise nur Signale des Zustands A, da H793 H<sup>ε1</sup> wahrscheinlich in drei Zuständen vorliegt und der hier als B bezeichnete Zustand ebenso einem Zustand A zugeordnet werden könnte. In Gruppe 3 wären mit Y762/A H<sup>δ</sup> und dem quantitativ nicht auswertbaren Signal H775/A H<sup>ε1</sup>, das jedoch den gleichen Prozess wie Y762/A H<sup>δ</sup> abzubilden scheint, wieder zwei Signale des Zustands A. Das hieße dann, dass PC2(680-796) in zwei Zuständen vorliegt, von denen der mit ca. 40 % etwas weniger stark populierte eine Kalziumaffinität im Bereich von Gruppe 1 aufweist. Der mit 60 % höher populierte Zustand zeigt hingegen eine geringere Kalziumaffinität und zwei Prozesse bei Kalziumzugabe an. Für die Berechnung nach dem Modell für drei Bindungsplätze wurde aus jeder Gruppe der K<sub>D</sub>-Wert mit dem geringsten Fehler und am besten im Spektrum auswertbaren Signal verwendet. Dieses Modell bezieht mit ein, dass von einem Bindungsplatz gebundene Kalziumionen nicht mehr als freies Kalzium in der Probe vorhanden sind und von anderen Bindungsplätzen gebunden werden können (Tabelle 43, vgl. 3.5.4.4). Mit dem drei Bindungsplatzmodell ergaben sich K<sub>D</sub>-Werte von 10 ± 2 μM für Bindungsplatz 1, 137 ± 18 μM für Bindungsplatz 2 und 612 ± 72 μM für Bindungsplatz 3. Bindungsplatz 1 wäre demnach den Zuständen B zuzuordnen. Die Bindungsplätze 2 und 3 dem Zustand A. Wie bereits erwähnt, wurde von Ćelić et al. für PC2(720-797), das nicht die α-helikale Bereiche vor EF-Hand 1 enthält, mittels ITC ein K<sub>D</sub>-Wert von 214 μM für Ca<sup>2+</sup>-Ionen ermittelt, während sie bei PC2(704-968), das eben diese Bereiche vor EF-Hand 1 enthält, eine viel höhere Affinität beobachteten mit K<sub>D</sub> = 12 μM (Ćelić et al., 2008). Allen et al. ermittelten für das Fragment PC2(717-792), dem der α-helikale Bereich vor EF-Hand 1 fehlt einen K<sub>D</sub>-Wert von 122 ± 5.2 μM (Allen et al., 2014). Der in dieser Arbeit für Zustand B von PC2(680-796) ermittelte K<sub>D</sub>-Wert liegt mit 10 ± 2 μM sehr nahe an dem von Ćelić et al. bei PC2(704-968) beobachteten K<sub>D</sub>-Wert von 12 μM (Ćelić et al., 2008).



**Abbildung 89: Darstellung der Aminosäuren im Verlauf der Kalziumtitration der verfolgten Signale auf der 3D-Struktur (PDB: 2Y4Q)**

Gezeigt werden die Aminosäuren der im Verlauf der Kalziumtitration verfolgten Signale F738 (grün), F759 (grün), Y762 (magenta), H750, H773, H775 (alle rot). In gelb dargestellt sind durch Strukturalignment mit Calmodulin in pyMOL identifizierte ungefähre potentielle Interaktionsflächen im Dimer (vgl. 5.2.3).

Von Schumann wurden N-terminale  $\alpha$ -helikale Bereiche für AS 683-692 und 699-717 vorhergesagt (Schumann et al., 2009a). Der Bereich von AS 699-717 ist auch beim Fragment PC2(704-968) von Ćelić et al. bis auf fünf fehlende Aminosäuren noch enthalten und könnte noch eine  $\alpha$ -helikale Struktur ausbilden. Demnach könnte ein  $\alpha$ -helikaler Bereich vor EF-Hand 1 von AS 699-717 entscheidend für die hochaffine Kalziumbindung sein, während der zweite helikale Bereich von AS 683-692 vernachlässigbar ist. Zustand B in dieser Arbeit würde dann einen Zustand von PC2(680-796) darstellen, bei dem die  $\alpha$ -helikalen Strukturen und damit EF-Hand 1 korrekt gefaltet sind und in einer hohen Kalziumaffinität ( $10 \pm 2 \mu\text{M}$ ) resultieren. Dieser Zustand B liegt zu ca. 40 % vor. PC2(680-796) läge dann zu 60 % in einem Zustand A vor, bei dem die  $\alpha$ -helikalen Strukturen und damit EF-Hand 1 nicht korrekt ausgebildet sind, wodurch die Kalziumaffinität um über das zehnfache herabgesetzt wird ( $K_D = 137 \pm 18$ ). Dieser  $K_D$ -Wert liegt im Bereich der von Allen et al. mit  $122 \pm 5.2 \mu\text{M}$  und Ćelić et al. mit  $214 \mu\text{M}$  ermittelten  $K_D$ -Werte für Fragmente, denen der  $\alpha$ -helikale Bereich vor EF-Hand 1 fehlt (Allen et al., 2014; Ćelić et al., 2008). Der in dieser Arbeit ermittelte hohe dritte  $K_D$ -Wert von  $612 \pm 72 \mu\text{M}$  zeigt einen bisher unbekannten Prozess an, der jedoch vermutlich auf einem reinen Ionenstärkeeffekt basiert.

Die in dieser Arbeit ermittelten Werte aus den Diffusionsmessungen zeigen eine scheinbare Molekülmasse von  $32048 \pm 2527 \text{ g/mol}$  an, die etwas über der theoretischen Molekülmasse eines Dimers von  $27,875 \text{ g/mol}$  liegt. Bereits bei Wierschem zeigten die Messungen für mittlere pH-Werte bei Kalziumsättigung ohne Hochsalz ein Dimer für PC2(680-796) an (Wierschem, 2013). Schumann et al. ermittelten für Bedingungen unter Hochsalz ein Monomer für PC2(680-796) (Schumann et al., 2009a). Der in dieser Arbeit beobachtete Wert aus den Diffusionsmessungen, der im Mittel etwas größer als ein Dimer von PC2(680-796), stellt wahrscheinlich eine Mischung aus mono-, di- und tetrameren Zuständen dar, wie sie bereits von Ćelić et al. beobachtet wurde (Ćelić et al., 2008, 2012). Ein Strukturhomologieabgleich mit dem bekannten EF-Hand-Protein Calmodulin zeigte, dass die verwendeten Markersignale nicht in der potentiellen

Interaktionsfläche eines PC2-Dimers liegen. Daher ist zu vermuten, dass das 60 : 40 von Zustand A zu B Verhältnis kein Polymergleichgewicht widerspiegelt (vgl. 5.2.3).

Sowohl Allen et al. als auch Petri et al. postulieren, dass die atypische EF-Hand 1 mit der kanonischen EF-Hand 2 zwar interagiert und mit ihr eine gemeinsame Struktur ausbildet, jedoch kein  $\text{Ca}^{2+}$  binden kann (Allen et al., 2014; Ćelić et al., 2008). Diese Arbeit unterstützt die These, dass die korrekte Ausbildung von EF-Hand 1 essentiell für eine hochaffine Bindung von Kalziumionen ist. Die Frage, ob jedoch beide oder nur eine EF-Hand ein Kalziumion binden konnte nicht abschließend geklärt werden.

### **5.1.3 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste in An- und Abwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$**

Die Säurekonstanten von Histidinen in Proteinen geben Einblick in ihre chemische Umgebung und Funktion (Tanokura, 1983). H709 liegt in einem vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Bereich 18 AS vor EF-Hand 1 und H750 befindet sich im Linker zwischen den beiden EF-Händen. H773 liegt in der Sequenz in EF-Hand 2 und H775 direkt dahinter. H793 liegt im Bereich des ERR-Signals (1.5.1). Die Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(680-796) wurden sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bestimmt. Dazu wurden die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine H709, H750, H773, H775 und H793 im Verlauf der pH-Titrations beobachtet und deren chemische Verschiebung gegen den pH-Wert aufgetragen. In Anwesenheit von Kalziumionen wurden für H709, H750, H773 und H775 anhand der  $\text{H}^{\epsilon 1}$  zwei Zustände zugeordnet, für H793 sogar drei. Die Ergebnisse der Histidine scheinen im Wesentlichen das bereits aus der Kalziumtitration bekannte Verhältnis zweier Zustände zu bestätigen. Y762/B  $\text{H}^{\delta}$  ist wie schon aus der Kalziumtitration und den Zuordnungsexperimenten bekannt stark verbreitert. Während der gesamten Titration scheint Y762/B  $\text{H}^{\delta}$  zu ca. 50 % populierte zu sein, auch wenn die Zustände ab pH 8,20 nicht mehr getrennt ausgewertet werden können. Es scheint sich ab pH 7,13 ein Verhältnis von 50 zu 50 % von Zustand B und A von Y762  $\text{H}^{\delta}$  einzupendeln. Bei den niedrigeren pH-Werten ist Zustand A weniger stark vertreten, bei pH 5,40 nur zu 28 % populierte. Zustand A von Y762  $\text{H}^{\delta}$  ist wie aus der Kalziumtitration bekannt erst bei höheren Kalziumkonzentrationen voll populierte. Der niedrige pH verringert vermutlich die Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und führt zu der niedrigeren Population des für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen weniger affinen Zustands A. F738/B  $\text{H}^{\delta}$  ist zu 50-60 % populierte und verhält sich damit wie bereits aus der Kalziumtitration bekannt wie Y762/B  $\text{H}^{\delta}$ . Es ist aus der Kalziumtitration bekannt, dass diese Zustände schon bei geringen Kalziumkonzentration ihre Maximalpopulation erreichen. Es befinden sich 40.5 mM  $\text{CaCl}_2$  in der Probe. Bei den niedrigsten pH-Werten in dieser Titrationsreihe zeigt nur Y762/A  $\text{H}^{\delta}$  eine Verminderung des Integrals. Der pH-Wert von 5.40 setzt die Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen folglich nicht soweit herab, dass bei 40.5 mM Kalzium in der Probe auch eine Sättigung von Y762  $\text{H}^{\delta}$ /B und F738  $\text{H}^{\delta}$ /B verhindert wird. Typische pK-Werte für Histidine in Proteinen sind nach Markley et al. im Bereich von  $6,72 \pm 0,02$  bis  $5,79 \pm 0,07$  zu finden (Markley, 1975). Die ermittelten pK-Werte der fünf Histidine mit ihren zwei Zuständen bewegen sich mit Ausnahme von  $\text{H}^{\epsilon 1}$  H750, das mit  $7,22 \pm 0,02$  für beide Zustände etwas darüber liegt, mehr oder weniger in diesem Bereich. Eine Besonderheit stellt das H775/A  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signal dar, das zwei verschiedene pK-Werte abbildet. Die pK-Werte der Phenylalanine und der beiden Zustände des Tyrosins scheinen im Wesentlichen die bereits an den Histidinen beobachteten pK-Werte anzuzeigen.

Es wurden ebenso Messungen in Abwesenheit von Kalziumionen in der Probe durchgeführt. Bei Eberhardt wurde bereits eine pH-Titration in Abwesenheit von Kalzium unter Hochsalzbedingungen durchgeführt. Hierbei waren keine einheitlichen Integrale für die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale zu beobachten und nur

vier der fünf  $H^{\epsilon 1}$ -Signale Histidine identifizierbar (Eberhardt, 2011). Unter den neuen Bedingungen ohne Hochsalz sind insgesamt sechs Signale zu sehen (Abbildung 36). Die Signale Y762/A + B  $H^{\delta}$ , F738/B  $H^{\delta}$  (Marker für Kalziumbindung) sind ohne Kalzium in der Probe nicht vorhanden und wurden somit nicht ausgewertet. Die  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine zeigen im Gegensatz zur Kalziumtitration ohne Kalzium in der Probe keine zwei sondern nur einen Zustand an. Jedoch sind bei der Kalziumtitration ohne Kalzium in der Probe die zweiten Zustände der  $H^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine schwer zu erkennen aber vorhanden. Zweite Zustände könnten demnach auch hier vorhanden, jedoch im Spektrum nicht aufgelöst sein.



## 5.2 NMR-spektroskopische Untersuchungen an $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) unter Hochdruck

### 5.2.1 Proteinzustand und Kalziumfreisetzung

In dieser Arbeit wurden Hochdruck-NMR-Messungen an  $^{15}\text{N}$ -gelabeltem PC2(717-792) bei 10 mM  $\text{CaCl}_2$  in der Probe durchgeführt. Es wurden Spektren bei Druckstufen von 1 MPa bis zu 250 MPa aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass der komplette Prozess reversibel war, sprich das aufgenommene Kontrollspektrum nach Durchführung des Experiments keine nennenswerten Unterschiede zum Ausgangsspektrum bei 1 MPa zeigte. Dies gilt sowohl für das 1D-NOESY als auch das HSQC-Spektrum. Anhand des  $\text{CH}_3$ -Bereich von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) bei 1.00-0.04 ppm im  $^1\text{H}$ -NOESY-Spektrum konnte außerdem bestätigt werden, dass es während der Druckreihe kein Protein verloren ging bzw. als Polymer unsichtbar wird. Außerdem liegt  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) auch bei den höchsten Drücken gefaltet und nicht als Random-Coil-Peptid vor, da keine scharfe Linien im Spektrum bei Tetrapeptidwerten sichtbar sind.

F738  $\text{H}^\delta$  ist aus den Kalziumtitrationen von Schumann et al. und Eberhardt sowie aus der Kalziumtitration aus 4.1.3 als Marker für die Kalziumbindung bekannt (Eberhardt, 2011; Schumann et al., 2009a). Bei Referenzierung auf Y762  $\text{H}^\epsilon$  ergibt sich bei 1 MPa ein Integral von 2,12 Protonen und somit eine Population von ca. 1 für F738  $\text{H}^\delta$ . Im Rahmen des Fehlers kann von einer vollständigen Besetzung des Proteins mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ausgegangen werden. In den 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) wird im Verlauf bei steigendem Druck sowohl eine Abnahme des Integrals als auch eine Verbreiterung des Signals F738  $\text{H}^\delta$  beobachtet. Mit der beobachteten Abnahme des Integrals verhält sich F738  $\text{H}^\delta$  mit steigendem Druck umgekehrt zu einer Kalziumzugabe. Im Fall der Druckanwendung nimmt das druckkorrigierte Integral von F738  $\text{H}^\delta$  ausgehend von einer Vollsättigung der EF-Hände mit Kalziumionen bei 1 MPa mit steigendem Druck linear ab bis es bei einem Druck von 160 MPa nicht mehr sichtbar ist (Abbildung 44, Abbildung 41). Ab diesem Druck wird dann höchstwahrscheinlich kein Kalzium mehr von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) gebunden. Die Kalziumionen scheinen sich durch den angewandten Druck von den EF-Händen zu lösen. Bei diesem Druck sind nur noch ca. 20 % der zugeordneten Peaks im HSQC-Spektrum sichtbar. Auch bei Allen et al. sind in den Spektren von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) ohne Kalzium in der Probe deutlich weniger Signale sichtbar als in Anwesenheit von Kalzium (Allen et al., 2014). Dies und die Tatsache, dass das bekannte Kalziummarkersignal F738  $\text{H}^\delta$  nicht mehr sichtbar ist, unterstützt die These, dass ab einem Druck von 160 MPa kein Kalzium mehr von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) gebunden ist.

### 5.2.2 3-Zustandsmodell und Diffusionsmessungen

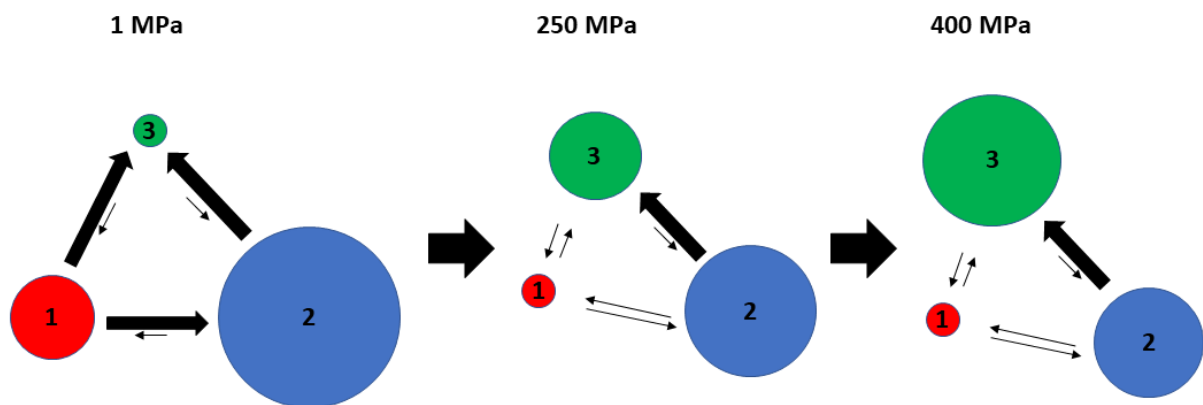
Proteine liegen normalerweise in konformationellen Gleichgewichten vor. Die Populationen verschiedener Konformere des Proteins im schnellen Austausch werden im thermischen Gleichgewicht von der Differenz der freien Enthalpien  $\Delta G_{1i}^0$  bestimmt. Je stabiler der Zustand, desto kleiner ist seine freie Enthalpie. Durch die Anwendung von Hochdruck können Konformere, die unter Normaldruck nur schwach populiert sind, stabilisiert und sichtbar gemacht werden. Das Auftreten einer Vielzahl von biphasischen Kurven deutet darauf hin, dass  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) in mindestens drei Zuständen vorliegt, d.h. es existieren mindestens zwei Übergänge. Es wurden  $\Delta G^0$  und  $\Delta V^0$ , die freien Enthalpien bei Normaldruck bzw. die partiellen molaren Volumen bei Normaldruck, für die zwei Übergänge im 3-Zustandsmodell errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 44 dargestellt.

$\Delta G_{12}^0$	$-3735 \pm 42 \text{ J/mol}$
$\Delta V_{12}^0$	$-53 \pm 18,28 \text{ ml/mol}$
$\Delta G_{13}^0$	$9663 \pm 25 \text{ J/mol}$
$\Delta V_{13}^0$	$-89,83 \pm 0,56 \text{ ml/mol}$
$\Delta G_{23}^0$	$13398 \pm 67 \text{ J/mol}$
$\Delta V_{23}^0$	$-36,83 \pm 18,84 \text{ ml/mol}$

**Tabelle 44: Ergebnisse des 3-Zustandsmodells im schnellen Austausch (3.5.7, Formel 21)**

Die freien Enthalpien  $\Delta G^0$  bestimmen die Populationsverhältnisse der Zustände von  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$  und zeigen damit die relativen Konzentrationen der einzelnen Zustände des Proteins bei Normaldruck an. Aufgrund des Prinzips des kleinsten Zwangs verschiebt sich bei Druckanwendung die Population immer in Richtung des Zustands mit dem kleineren partiellen molaren Volumen. Mit den Parametern aus Tabelle 44 wurden die Populationen der drei konformationellen Zustände von  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$  als Funktion des Drucks berechnet (vgl. Abbildung 50). In Abbildung 90 sind die Ergebnisse graphisch aufbereitet dargestellt. Die Messungen selbst wurden nur bis zu einem Druck von 250 MPa durchgeführt, im Modell werden die relativen Populationen der Konformere bis zu einem Druck von 400 MPa berechnet und dargestellt. Zustand 1 (rot) von  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$  nimmt kontinuierlich ab und ist ab 160 MPa praktisch nicht mehr vorhanden. Der bei Normaldruck kaum vorhandene Zustand 3 (grün) nimmt mit steigendem Druck fast exponentiell zu. Zustand 2 (blau) verhält sich nach anfänglichem Anstieg genau umgekehrt (vgl. Abbildung 50).

Die Diffusionsmessungen zeigen für  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$  bei Normaldruck mit  $16725 \pm 998 \text{ g/mol}$  die scheinbare Molekülmasse eines Dimers an, wie es bereits von dem Fragment PC2(680-796) unter diesen Bedingungen ohne Hochsalz bekannt ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich hinter diesem Messwert eine Mischung aus Mono-, Di- und höheren Polymeren verbirgt. Zustand 2 zeigt möglicherweise das Dimer im kalziumgebundenen Zustand an. Zustand 3 könnte das Monomer ohne Kalzium darstellen, dessen Population mit steigendem Druck aufgrund der Monomerisierung und der Kalziumfreisetzung zunimmt. Zustand 1 zeigt möglicherweise ein Tetramer im kalziumgebundenen Zustand an. Der Wert aus den Diffusionsmessungen bei 250 MPa  $11010 \pm 1020 \text{ g/mol}$  lässt darauf schließen, dass durch die Druckanwendung der Monomeranteil zunahm und der Dimeranteil ebenso wie der Tetrameranteil zurückging. Die Integralabnahme von Kalziummarkersignals F738  $\text{H}^\delta$  zeigt wahrscheinlich die Kalziumfreisetzung bei PC2(717-792), die demnach schon bei 160 MPa abgeschlossen wäre. Die Ergebnisse im 3-Zustandsmodell sagen jedoch voraus, dass bei 250 MPa noch fast 80 % Zustand 2 vorhanden sind, der als ein Dimer mit gebundenem Kalzium definiert wurde. Daher wäre es auch denkbar, dass die drei Zustände nur die Polymerzustände von PC2(717-792) wiedergeben. Die während der Druckreihe gemessenen relativen Diffusionskonstanten  $1/R_H$  wurden ebenso im 3-Zustandsmodell gefittet. Dadurch wurden die relativen Diffusionskonstanten der drei Zustände von  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$  bei Normaldruck erhalten und daraus wiederum die scheinbaren Molekülmassen erhalten. Zustand 1 (rot) weist im Modell eine unrealistisch hohe scheinbare Molekülmasse auf. Zustand 2 (blau) und Zustand 3 (grün) weisen beide Werte im Bereich des Monomers von  $^{15}\text{N-PC2(717-792)}$  auf. Konsistent mit den anderen Ergebnissen wäre die höchste Molekülmasse für Zustand 1, der möglicherweise das Tetramer anzeigt. Der Wert für Zustand 2, der als Dimer angenommen wird, wäre demnach zu niedrig. Aufgrund des hohen Fehlers bei Zustand 1 sind die Werte aus dem Fit der relativen Diffusionskonstanten für alle Zustände als relativ ungenau einzuschätzen.



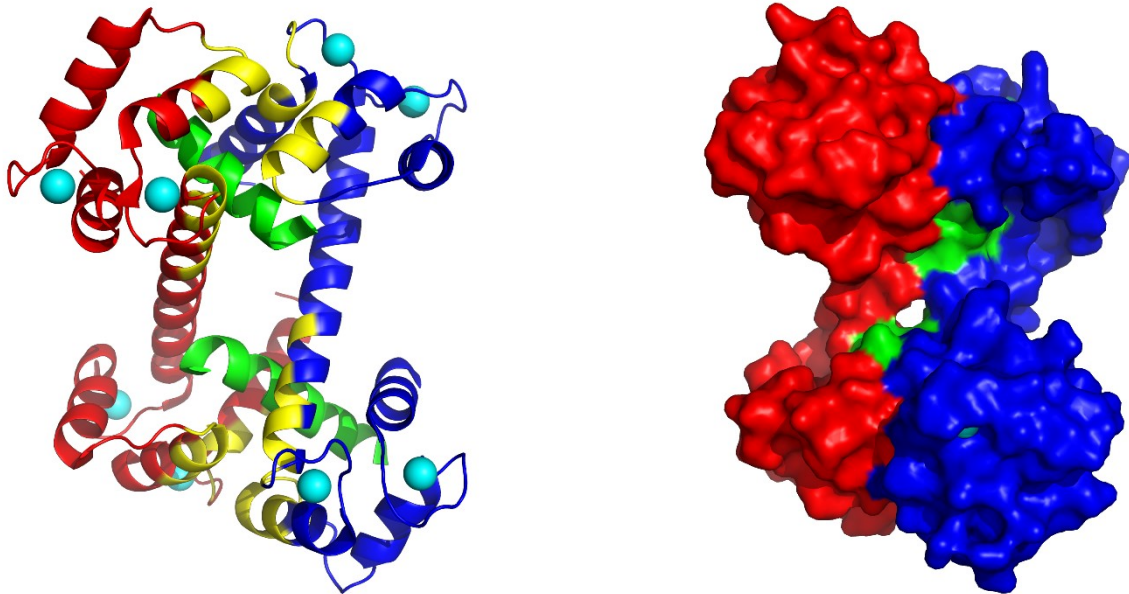
**Abbildung 90: Relative Populationen der konformationellen Zustände von PC2(717-792)**

Dicke Pfeile zeigen die Richtung der Populationsänderungen unter Druckerhöhung an. Unter Normaldruck (1MPa) dominiert Zustand 2 (blau). Zustand 3 (grün) ist nur minimal populiert. Mit höherem Druck nimmt die Population von Zustand 1 (rot) ab und nähert sich asymptotisch dem Wert 0. Anteile von Zustand 1 und 2 gehen mit höherem Druck in Zustand 3 über. Bei 250 MPa ist Zustand 2 noch etwas stärker als Zustand 3 populiert (höchster gemessener Druckpunkt). Der Fit aus Abbildung 50 zeigt, dass ab 400 MPa Zustand 3 dominiert. Darstellung der Populationen nicht maßstabsgetreu.

### 5.2.3 Potentielle Interaktionsflächen im Homodimer von PC2(717-792)

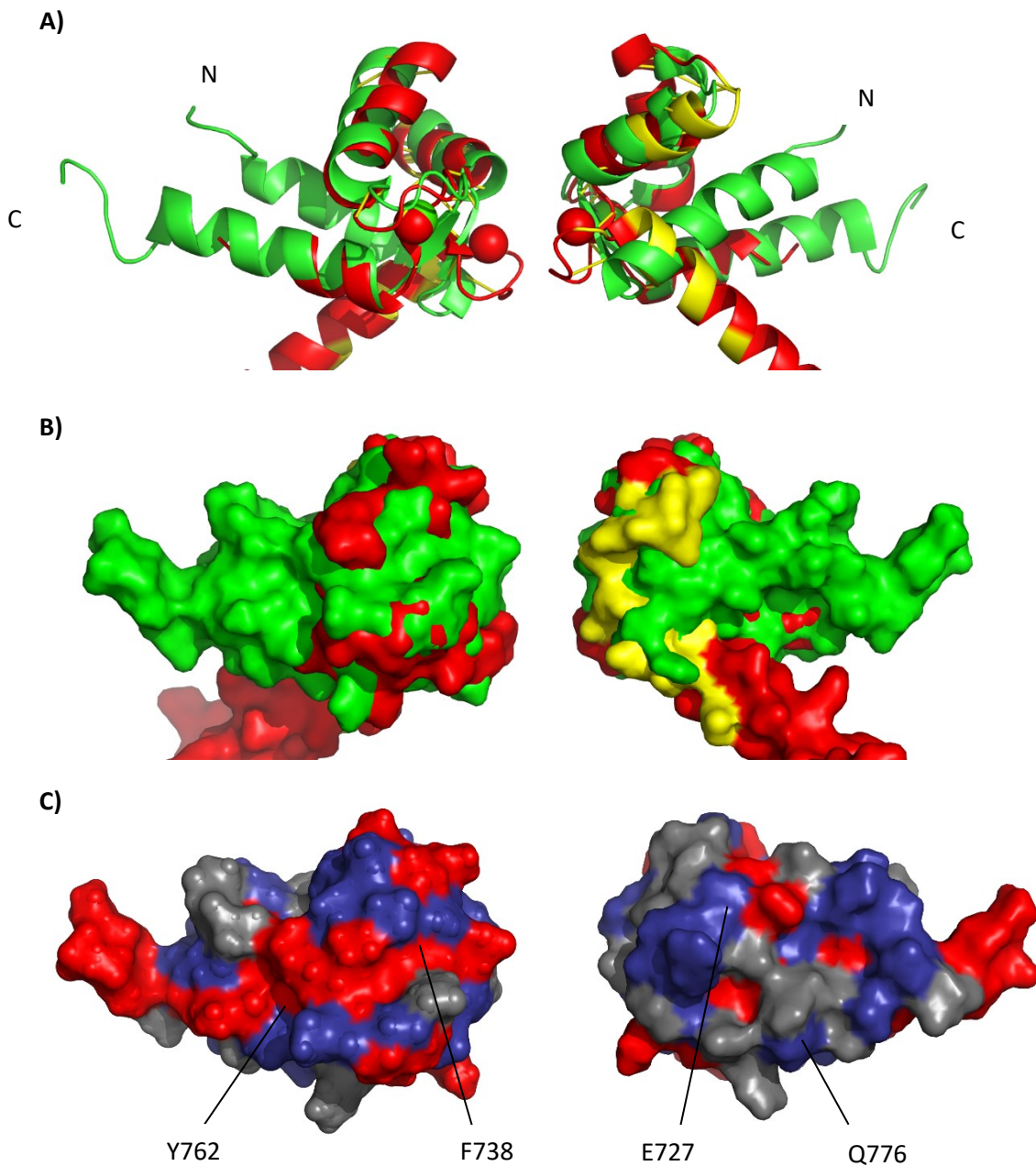
Die random-coil korrigierten kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen aus den HSQC-Spektren lieferten mit den Werten der Druckkoeffizienten  $B_2^*$  ein Maß dafür, in welchen Bereichen von  $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) die stärksten Effekte durch die Druckerhöhung auftraten. Da im Verlauf der Druckerhöhung zumindest von teilweisen einer Monomerisierung ausgegangen werden kann, war es möglich, dass die Aminosäuren mit den größten Änderungen die Polymerisationsdomäne von PC2(717-792) anzeigen. Der Bereich der EF-Hände von PC2(717-792) weist eine starke strukturelle Homologie zum Bereich der EF-Hände des kalziumbindendem regulatorischen Proteins Calmodulin auf, wie bereits von Allen et al. gezeigt wurde (Allen et al., 2014). Für das kalziumbindende EF-Hand-Protein Calmodulin wurde das Vorhandensein eines Monomer-Dimer-Gleichgewichts gezeigt. Das symmetrische Dimer entsteht durch nicht-kovalente Bindung. Das Dimer von Calmodulin ist essentiell für die spezifische Interaktion mit bestimmten Zielproteinen (Lafitte et al., 1999; Larsson et al., 2005). Es wird auch von einer ligandeninduzierten Dimerisierung von Calmodulin beschrieben (Zhang et al., 2008). Ye et al. zeigen die Kristallstruktur von Calmodulin im Komplex mit der Calmodulin-Bindedomäne der Phosphatase Calcineurin, wobei Calmodulin als Homodimer mit Head-to-Tail-Orientierung vorliegt (Abbildung 91), das zwei Einheiten der Calmodulin-Bindedomäne der Phosphatase Calcineurin bindet (Ye et al., 2008). In Abbildung 91 sind außerdem die mit *Chimera 1.12* bestimmten Interaktionsflächen der Einheiten im Homodimer gelb markiert. Abbildung 92 zeigt die Überlagerungsdarstellung von PC2(717-792) mit dem C-terminalen EF-Hand-Paar von Calmodulin. Die Druckkoeffizienten 2. Ordnung  $B_2^*$  der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen zeigen starke Effekte in den beiden C-terminalen Helices von PC2(717-792). Die Interaktionsflächen im Homodimer Calmodulin würden jedoch Effekte bei den beiden N-terminalen Helices von PC2(717-792) erwarten lassen. Falls die beobachteten Effekte an PC2(717-792) Interaktionsflächen im Homodimer darstellen, würden sich diese deutlich von den Interaktionsflächen im Homodimer Calmodulin unterscheiden. Wahrscheinlicher ist, dass hier die konformationellen Änderungen aufgrund der Kalziumfreisetzung sichtbar werden. Für PC2(717-792)

wird nur eine funktionierende EF-Hand vorgeschlagen, die von den beiden C-terminalen Helices ausgebildet wird, während die EF-Hand der N-terminalen Helices nicht zur Kalziumbindung fähig sein soll (Allen et al., 2014). Dies würde erklären, warum nur für erstere Effekte zu beobachten sind, da möglicherweise das dort freigesetzte Kalziumion zu starken Konformationsänderungen in eben diesem Bereich führt. Denkbar ist auch, dass die konformationellen Änderungen aufgrund der Kalziumfreisetzung an der kanonischen EF-Hand viel stärker als die konformationellen Änderungen einer Monomerisierung sind und deshalb erstere Effekte letztere überlagern. In diesem Fall wäre eine Interaktionsfläche im Dimer bei PC2(717-792) analog zu Calmodulin im Bereich der N-terminalen Helices denkbar.



**Abbildung 91: Cartoondarstellung (links) und Oberflächendarstellung (rechts) der Head-to-Tail Dimerstruktur von Calmodulin im Komplex mit der Calmodulin-Bindedomäne der Phosphatase Calcineurin (PDB: 2R28).**

Einheiten Calmodulin in rot und blau. Phosphatase Calcineurin grün. Kalziumionen in cyan. Links: Mit Chimera 1.12 bestimmte Interaktionsflächen der Einheiten im Homodimer in gelb dargestellt.



**Abbildung 92: A) Überlagerungsdarstellung von PC2(717-792), PDB: 2Y4Q (grün) mit C-terminalem EF-Hand-Paar von Calmodulin, PDB: 2R28 (rot). B) Oberflächendarstellung von A. C) Konformationelle Änderungen bei PC2(717-792) unter Hochdruck**

In A) und B) gelb dargestellt sind die mit Chimera 1.12 bestimmten Interaktionsflächen im Homodimer von Calmodulin. Das Strukturalignment erfolgte mit dem Programm *pyMOL*. C) Effekte der Druckkoeffizienten  $B_2^*$  von PC2(717-792) oberhalb  $\Theta_0$  in rot. Unterhalb  $\Theta_0$  in blau. Grau bedeutet keine Information aus den Messungen

### **5.3 Interaktion verschiedener Fragmente von PC2 mit dem Formin mDia1(69-451)**

Formine spielen eine essentielle Rolle bei der Umgestaltung des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts und bestimmen so die Form und das Verhalten der eukaryotischen Zelle (Chesarone et al., 2010). Mutationen in den Formingenen verursachen schwere Defekte bei der Zytokinese, Zellpolarität sowie bei der Zell- und Gewebemorphogenese in Fliegen, Mäusen und Hefen (Breitsprecher and Goode, 2013). Zahlreiche Arbeiten haben zelluläre Faktoren identifiziert, die Formine rekrutieren, aktivieren oder inaktivieren, um deren Effekte auf die Aktinnukleation und die Aktinelongation zu regulieren (Chesarone et al., 2010). Die Interaktion von PC2 mit dem Formin mDia1 könnte ein notwendiger Faktor bei all diesen Prozessen sein. Eine Störung dieser Interaktion könnte ein Grund für die bei der ADPKD auftretende Zystenbildung sein. Rundle et al. konnten bereits 2004 eine Interaktion von PC2 mit dem Formin mDia nachweisen. Dabei bindet der cytosolische C-Terminus von PC2 (im Bereich nach Glu871) den N-Terminus von mDia (AS 143-260) (Rundle et al., 2004). Bai et al. 2008 stellten zudem fest, dass mDia bei physiologischen Ruhepotentialen spezifisch an PC2 bindet und es dadurch blockiert (Bai et al., 2008; Tsiokas, 2009). Auch Eberhardt konnte eine Interaktion des C-terminalen Abschnitts PC2(680-796) mit mDia1(69-451) zeigen und dabei beobachten, dass mDia1(69-451) mit dem Bereich der EF-Hände von PC2(680-796) interagiert und einen  $K_D$ -Wert von  $39,3 \pm 13,7 \mu\text{M}$  ermitteln (Eberhardt, 2011). In dieser Arbeit wurde die Interaktion des Formins mDia1(69-451) mit den Fragmenten PC2(680-796) und PC2(717-792) untersucht.

#### **5.3.1 Interaktion von PC2(680-796) mit dem Formin mDia1(69-451)**

Für das längere Fragment PC2(680-796) wurden für einen Teil der Aminosäuren ohne mDia1 in der Probe zwei Zustände zugeordnet. Diese Signale waren bei der hochkonzentrierten PC2(680-796)-Probe (1 mM PC2) im Spektrum nicht getrennt von einander aufgelöst und als nur ein Signal sichtbar, das gemäß der Peakliste von Schumann (Schumann et al., 2009b) unter Einbeziehung der verbesserten Zuordnung von Eberhardt (Eberhardt, 2011) zugeordnet wurde. Bei der für die mDia1-Titration verwendeten deutlich geringeren Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  PC2 ist jedoch für mehrere Aminosäuren eine Aufspaltung der Signale in zwei Zustände zu erkennen. Dies trifft auf die Aminosäuren Y684, E686, A692, E699, L700, L703, R730, F738, Q743, Y762, D763, D767, L791, H793, L796 zu. Die mittlere Population ergibt für die Zustände A den Wert 0,72 und für die Zustände B den Wert 0,28. Dies entspricht ungefähr dem bereits aus der Kalziumtitration bekannten Verhältnis Zustände A und B von ca. 0,6 zu 0,4 bei einer Sättigung von PC2(680-796) mit Kalziumionen, wie sie auch in diesem Experiment gegeben ist (vgl. 4.1.3). Die größten kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen sind im Bereich des Linkers zwischen den beiden EF-Händen, bei den beiden EF-Händen selbst sowie im vereinzelt auch in den vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Bereichen zu beobachten. Bei den verfolgten zweiten Zuständen zeigen die Aminosäuren E686/B, E699/B, deren Zustände A bereits starke Verschiebungsänderungen zeigen, sowie F738 (EF-Hand 1), D767 (EF-Hand 2) und die letzte Aminosäure des Fragments L796 signifikante Änderungen. Bei den Volumina sind die stärksten Änderungen im Bereich des Linkers zwischen den beiden EF-Händen zu beobachten. Auch Aminosäuren aus EF-Hand 1 und 2, sowie dem vorhergesagten  $\alpha$ -helikalen Bereich 699-717 zeigen vereinzelt starke Änderungen der Signalvolumina. Die bei weitem stärksten Änderungen der Signalvolumina zeigen jedoch die Zustände B der Aminosäuren Y684, L700, L703, R730 und D763, deren Signale bei 300  $\mu\text{M}$  mDia1 in der Probe im Spektrum nicht mehr sichtbar sind. Für diese Aminosäuren trifft ebenso wie auf E686, F738, Y762 und D767 zu, dass ihre zweiten Zustände B eine

viel stärkere Abnahme der Signalvolumina aufweisen als ihre Zustände A. Dies deutet darauf hin, dass der etwas schwächer populierte Zustand B von PC2(680-796) von mDia1(69-451) bevorzugt gebunden wird, während die Affinität für Zustand A von PC2(680-796) deutlich schwächer zu sein scheint. Anhand der Abnahme der Signalvolumina der Zustände B der Aminosäuren L703 (vorausgesagter  $\alpha$ -helikaler Bereich), R730 (atypische EF-Hand 1) und D763 (kanonische EF-Hand 2) wurde ein mittlerer  $K_D$ -Wert von  $43 \pm 20 \mu\text{M}$  für die Interaktion von PC2(680-796) in Zustand B mit mDia1(69-451) errechnet. Dieser Wert liegt sehr nahe an dem von Eberhardt ermittelten  $K_D$ -Wert von  $39,3 \pm 13,7 \mu\text{M}$  (Eberhardt, 2011).

### **5.3.2 Interaktion von PC2(717-792) mit dem Formin mDia1(69-451)**

Für das kurze Fragment PC2(717-792) wurden im Vergleich zum längeren Fragment PC2(680-796) keine zwei Zustände beobachtet. Dem kurzen Fragment PC2(717-792) fehlen die von Schumann et al. vorhergesagten N-terminale  $\alpha$ -helikale Bereiche AS 683-692 und 699-717 (Schumann et al., 2009a). Das Fragment zeigt bei Zugabe von mDia1 hauptsächlich im Bereich der beiden EF-Hände sowie im Linker zwischen den beiden EF-Händen signifikante Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen. Bei den Signalvolumina konnte keine Abnahme, sondern sogar eine leichte Zunahme durch die mDia1-Zugabe verzeichnet werden. Diese liegt jedoch innerhalb des mess- und auswertungsbedingten Fehlerbereichs. Daher wird davon ausgegangen, dass keine echten Volumeneffekte vorliegen. Da eine Abnahme der Signalvolumina für eine stärkere Bindung spricht und hier nur Änderungen der chemischen Verschiebungen zu beobachten sind, muss von einer eher geringen Affinität von mDia1(69-451) für PC2(717-792) ausgegangen werden. Die mDia1(69-451)-Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  im fünffachen Überschuss zu PC2(717-792) reicht nach diesen Ergebnissen nicht aus, um in einen Sättigungsbereich vorzudringen und eine Abnahme der Signalvolumina in den Spektren zu zeigen. Trotzdem können anhand der chemischen Verschiebungsänderungen Bindungseffekte nachgewiesen werden. Anhand der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Aminosäuren H750 und A757 wurde ein mittlerer Gesamt- $K_D$ -Wert von ca.  $191 \mu\text{M}$ , der jedoch einen viel zu hohen Fehler aufweist, um eine genaue Aussage über die Affinität von PC2(717-792) für mDia1 treffen zu können.

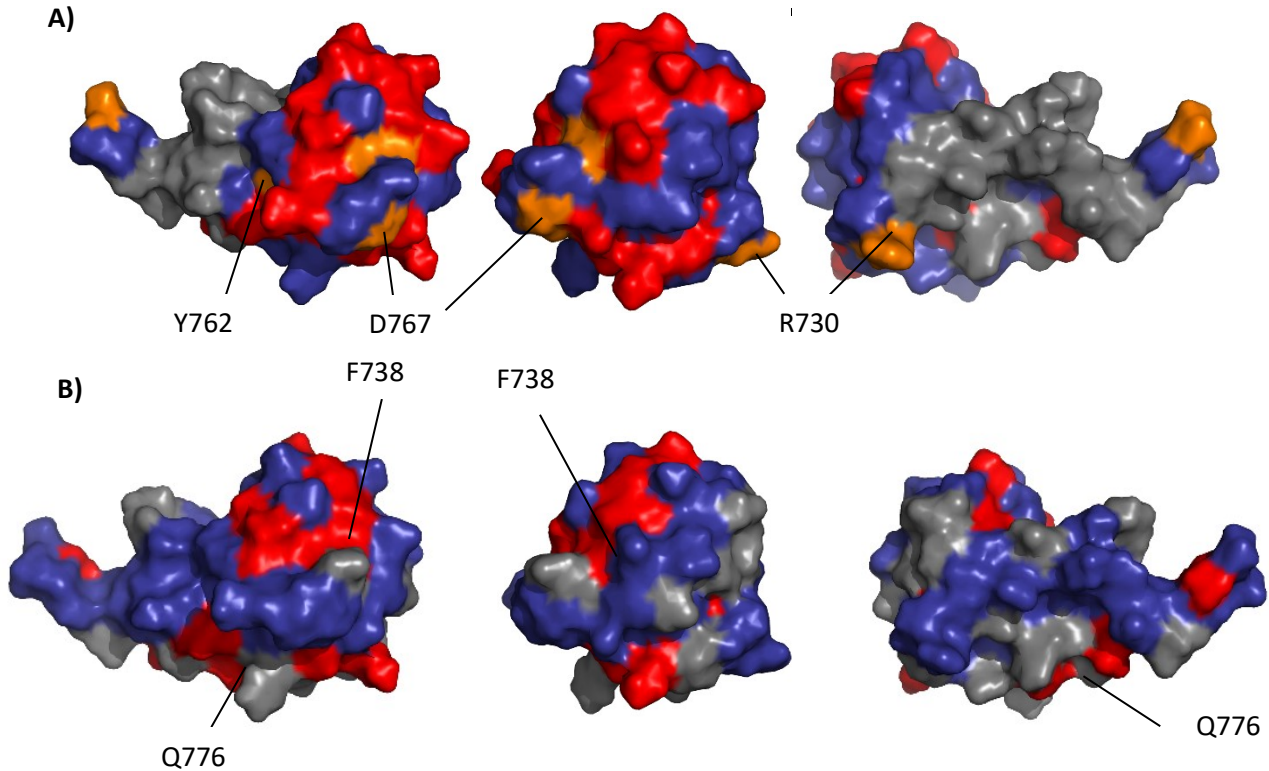
### **5.3.3 Vergleich der Interaktionen von PC2(680-796) und PC2(717-792) mit dem Formin mDia1(69-451)**

PC2(680-796) zeigt in Zustand B für die Interaktion mit dem Formin mDia1 einen mittleren  $K_D$ -Wert von  $43 \pm 20 \mu\text{M}$  an. Zustand A von PC2(680-796) besitzt wahrscheinlich ebenso wie Fragment PC2(717-792) eine deutlich schwächere Affinität. In Abbildung 93 sind die Effekte der mDia1-Zugabe auf die beiden verwendeten PC2-Fragmente dargestellt. In A) sind für PC2(680-796) deutlich stärkere Effekte als in B) für PC2(717-792) zu sehen. Die Bereiche der beobachteten Interaktion der beiden PC2-Fragmente mit mDia1 ähneln sich dennoch sehr stark. Beide Fragmente zeigen Interaktionsflächen im Bereich der EF-Hände und im Linker dazwischen. Bereits Eberhart konnte zeigen, dass mDia1 PC2(680-796) im Bereich der EF-Hände bindet und diese möglicherweise wie eine Art Klammer umschließt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass von Schumann et al. vorhergesagte N-terminale  $\alpha$ -helikale Bereiche von AS 683-692 und 699-717 entweder direkt oder indirekt über eine Stabilisierung der EF-Hände, wie wahrscheinlich nur in Zustand B von PC2(680-796) vorhanden, für eine



physiologisch relevante Interaktion von PC2 mit mDia1 benötigt wird (vgl. Schumann et al., 2009a). Für eine direkte Beteiligung des  $\alpha$ -helikale Bereichs an der Bindung würde sprechen, dass die N-terminalen Aminosäuren Y684, E686, A692, E699, L700 und L703 sehr starke Volumenabnahmen zeigen. Dies gilt hauptsächlich für die Zustände B dieser Aminosäuren.



**Abbildung 93:** Darstellung der Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderung und der Volumenänderungen der Signale von A) PC2(680-796) und B) PC2(717-792) durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) auf der 3D-Struktur (PDB: 2Y4Q)

(A) Oberflächendarstellung: Die Aminosäuren mit Änderungen oberhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$  sind rot markiert. Orange markiert sind die Aminosäuren, die nur in Zustand B Werte oberhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$  zeigen. Blau steht für Änderungen unterhalb von  $\sigma_0^{\text{kor}}$ . Grau bedeutet keine Zuordnung oder Signal im Verlauf der Titration nicht verfolgbar. (B) Cartoondarstellung von A. Das Kalziumion in der kanonischen EF-Hand ist in grün eingezeichnet.



## 5.4 PC2(720-797)

### 5.4.1 Interaktion von PC2(720-797) mit $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in $\text{D}_2\text{O}$

Bei der Kalziumtitration von PC2(720-797) bei pH 5,6 erscheinen die beiden bereits von dem Fragment PC2(680-796) bekannten Markersignale F738  $\text{H}^\delta$  und Y762  $\text{H}^\delta$  bei Kalziumzugabe im Spektrum und nehmen bis zu einem Sättigungswert zu. Bei einer Kalziumkonzentration von 43,2 mM liegt das Signal von F738  $\text{H}^\delta$  bei 6,58 ppm und das Signal von Y762  $\text{H}^\delta$  bei 7,40 ppm. Für beide Aminosäuren ist bei pH 5,6 nur ein Zustand zu beobachten. Es wurde anhand des F738  $\text{H}^\delta$ -Signals ein  $K_D$ -Wert von  $2,94 \pm 0,49$  mM bei pH 5,6 für Kalziumionen bestimmt. Dieser Wert erscheint sehr hoch im Vergleich zu den bekannten Affinitäten. Y762  $\text{H}^\delta$  konnte aufgrund von Überlagerungen nicht quantitativ ausgewertet werden, scheint sich aber während der Titration analog zu F738  $\text{H}^\delta$  zu verhalten. Y762  $\text{H}^\delta$  und F738  $\text{H}^\delta$  weisen zudem bei maximaler Kalziumkonzentration ein nahezu identisches Integral auf (Verhältnis 1 : 1,09).

Bei der Interaktion von PC2(720-797) mit Kalziumionen bei pH 6,8 konnte wieder eine Integralzunahme der beiden Markersignale F738  $\text{H}^\delta$  und Y762  $\text{H}^\delta$  bei Kalziumzugabe im Spektrum festgestellt werden. Es wurden die  $K_D$ -Werte  $1,16 \pm 0,14$  mM für F738  $\text{H}^\delta$  und  $1,26 \pm 0,15$  mM für Y762  $\text{H}^\delta$  bestimmt. Diese Werte sind wiederum als relativ hoch einzuschätzen, d.h. die Affinität für Kalziumionen ist gering. Ab einer Kalziumkonzentration von 4,86 mM ist eine beginnende und mit steigender Kalziumkonzentration zunehmende Aufspaltung des Signals Y762  $\text{H}^\delta$  in zwei Signale mit in etwa gleich großen Anteilen erkennbar, wie sie bereits in ähnlicher Weise vom Fragment PC2(680-796) bekannt ist. Y762/A  $\text{H}^\delta$  scheint mit 54 % im Vergleich zu Y762/B  $\text{H}^\delta$  mit 46 % etwas stärker populiert. Im Verhältnis zu F738  $\text{H}^\delta$  ist das Gesamtintegral von Y762/A  $\text{H}^\delta$  und Y762/B  $\text{H}^\delta$  in etwa doppelt so groß. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den Experimenten mit PC2(680-796) überein, bei denen das Signal F738  $\text{H}^\delta$  nur zu ca. 50 % populiert ist. Ungewöhnlich ist, dass nur bei pH 6,8 zwei Zustände von Y762  $\text{H}^\delta$  zu identifizieren sind. Bei pH 5,6 ist möglicherweise die Affinität für den zweiten Zustand zu stark herabgesetzt. Generell sind die ermittelten Affinitäten für Kalziumionen sowohl bei pH 5,6 als auch 6,8 für PC2(720-797) als sehr schwach zu bewerten. Ćelić et al. zeigten an PC2(720-797) einen  $K_D$ -Wert von 214  $\mu\text{M}$  für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Ćelić et al., 2008). Eine Ursache für die schwachen Affinitäten könnte der lange Aminosäurenrest bei diesem Fragment sein (s. dazu 5.4.3).

### 5.4.2 Bestimmung der Säurekonstanten der Histidinreste von PC2(720-797)

Das Fragment PC2(720-797) enthält die vier Histidine H750, H773, H793, H775 und damit ein Histidin weniger als das lange Fragment PC2(680-796). H709 fehlt bei dem Fragment PC2(720-797). In Abwesenheit von Kalziumionen sind bei pH 5,57 im Spektrum klar die vier  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der vier Histidine zu erkennen, die annähernd gleiche Integrale aufweisen. Im weiteren Verlauf der Titration hin zum basischen pH-Bereich treten jedoch bei H750  $\text{H}^{\epsilon 1}$  und bei H775  $\text{H}^{\epsilon 1}$  Nebenpeaks auf, die wahrscheinlich einen zweiten Zustand des jeweiligen Histidins anzeigen. Im mittleren pH-Bereich stimmen die Integrale nicht überein, ab pH 8,62 erscheinen sie wieder einheitlicher. Im Verlauf der Titration in Richtung basischen Bereich shiften die vier  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale, inklusive der zeitweise auftretenden Nebenpeaks, in Richtung Hochfeld. Es wurden die pK-Werte für  $\text{H}^{\epsilon 1}$  H750 = 7.24,  $\text{H}^{\epsilon 1}$  H773 = 6.95,  $\text{H}^{\epsilon 1}$  H793 = 6.88 und  $\text{H}^{\epsilon 1}$  H775 = 6.59 ermittelt. Diese entsprechen den typischen pK-Werten für Histidine in Proteinen (Markley, 1975).

In Anwesenheit von Kalziumionen zeigen die  $\text{H}^{\epsilon 1}$ -Signale der vier Histidine ein sehr uneinheitliches Bild. Sowohl die wechselnde Anzahl der Signale als auch die nicht übereinstimmenden Integrale machten eine Auswertung nahezu unmöglich. Es wurde trotzdem für

das als H<sup>ε1</sup> H750 zugeordnete Signal, das ebenso ein uneinheitliches Integral im Verlauf der Titration aufweist, ein pK-Wert errechnet. Dieser ist mit 6.90 etwas niedriger als der pK-Wert 7.24 für das H<sup>ε1</sup> H750 in Abwesenheit von Kalziumionen.

### 5.4.3 Aggregationszustand von PC2(720-797)

Die mittels *Protparam* anhand der Sequenz errechnete theoretische Molekülmasse ergibt für das Monomer von PC2(720-797) inklusive zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen einen Wert von 10.738 kD. Ćelić et al. ermittelten ein Monomer für PC2(720-797) (Ćelić et al., 2008). Für das längere PC2(704-968) zeigten sie ein Gemisch aus Di-, Tri- und Tetramer (Ćelić et al., 2012), während sie in einem früheren Paper von einem Mono-Dimer-Gleichgewicht für PC2(704-968) ausgehen (Ćelić et al., 2008). Sie gehen außerdem davon aus, dass die in diesem Fragment enthaltene coiled-Coil-Domäne von PC2 für die Oligomerisierung notwendig ist (Ćelić et al., 2012).

Bei Kalziumsättigung konnte in dieser Arbeit für PC(720-797) für alle pH-Bereiche (pH 5,6, pH 7,8 und pH 9,0) ein Monomer ermittelt und damit die Ergebnisse von Ćelić et al. für dieses Fragment bestätigt werden. In Abwesenheit von Kalziumionen zeigen die Daten ein Tetramer für PC2(720-797) an. Auch hier liegt keine pH-Abhängigkeit des Aggregatzustands vor. Bereits Schumann et al., Eberhardt und Wierschem zeigten, dass eine Kalziumzugabe zur Bildung von niedrigeren Polymeren des langen Fragments PC2(680-796) führt. Ohne Kalzium und Hochsalz in der Probe lag PC2(680-796) zumeist als Tetramer vor, während die Diffusionsmessungen nach Kalziumzugabe ein Dimer anzeigten. Unter Hochsalz (350-500 mM NaCl) führte die Kalziumzugabe zu einer Monomerisierung von PC2(680-796) (Eberhardt, 2011; Schumann et al., 2009a; Wierschem, 2013). Die Favorisierung von niedrigeren Polymeren bei Zugabe von Kalziumionen konnte bei PC2(720-797) bestätigt werden. Warum PC2(717-792) aus dieser Arbeit die scheinbare Molekülmasse eines Dimers aufweist, während das Fragment PC2(720-797) in Anwesenheit von Kalzium als Monomer vorliegt, darüber kann nur spekuliert werden. Auffällig ist, dass bei Ćelić et al. der Histidin-Tag (MGSSHHHHHSSGLVPRGSHM) des Fragments nicht entfernt wurde und somit zusätzliche Aminosäuren vorhanden sind, die evtl. Einfluss auf die Messungen nehmen. Auch das in dieser Arbeit verwendete Fragment PC2(720-797) enthielt mit den Aminosäuren GSHMASMTGGQQMGRSG einen relativ langen Tag aufgrund einer nicht optimal gewählten Schnittstelle. Dies war bei den anderen in dieser Arbeit verwendeten Fragmenten nicht der Fall. Diese langen nicht zum Protein gehörenden Sequenzen könnten die Messungen beeinflusst haben.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erkrankte polyzystische Niere .....	9
Abbildung 2: Modellschema der Zystenbildung bei ADPKD (Mochizuki et al., 2013).....	10
Abbildung 3: Die Proteinfamilie der Polycystine (Zhou, 2009) .....	11
Abbildung 4: Funktionelle Untergliederung des PC2 (PKD2)-Kanals.....	13
Abbildung 5: Schematische Darstellung der strömungsinduzierten Scherkräfte und der Kalzium-Signalübertragung in embryonalen Nierenzellen der Maus .....	15
Abbildung 6: Modell des PC2 (PKD2)-Transports .....	17
Abbildung 7: Kationbindungsstellen in PC2 .....	18
Abbildung 8: PC2-Struktur in Lipid Nanodiscs.....	19
Abbildung 9: Domänenstruktur der Diaphanous Formine und Liganden, von denen bekannt ist, dass sie die biochemischen Aktivitäten der Formine in Bezug auf Aktin regulieren .....	20
Abbildung 10: Modell der Regulation der mDia1-Aktivität.....	21
Abbildung 11: Aktivierung von PC2 durch mDia1 .....	23
Abbildung 12: Schematische Darstellung von Polycystin-1 und Polycystin-2 (Mochizuki et al., 2013) 24	
Abbildung 13: Aminosäuresequenzen der verwendeten C-terminalen Fragmente von PC2 .....	30
Abbildung 14: PC2(680-796) mit Ca <sup>2+</sup> -Bindungsstellen.....	31
Abbildung 15: Ribbon-Darstellung von PC2(717-792).....	32
Abbildung 16: Detaillierte Darstellung der EF-Hand von PC2(717-792) .....	32
Abbildung 17: Struktur von Ca <sup>2+</sup> -gebundenem PC2(720-797).....	33
Abbildung 18: Gesamtstruktur des mDia <sub>N</sub> -RhoC-Komplexes.....	34
Abbildung 19: Zuordnung der Ringprotonen im Aromatenbereich: 1D- <sup>1</sup> H -NOESY-Spektrum von PC2(680-796) bei 1.9 mM CaCl <sub>2</sub> .....	65
Abbildung 20: <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY-Spektrum (links) und <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-NOESY-Spektrum (rechts) von PC2(680-796) bei 1.9 mM CaCl <sub>2</sub> .....	66
Abbildung 21: Vergrößerter Ausschnitt der H <sup>ε1</sup> -Signale der fünf Histidine .....	67
Abbildung 22: Vergrößerter Ausschnitt der Crosspeaks der H <sup>δ2</sup> - und H <sup>ε1</sup> -Signale der fünf Histidine im <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-TOCSY-Spektrum.....	67
Abbildung 23: 3D-Strukturen des C-Terminus von PC2: Links Fragment AS 717-792 (PDB: 2Y4Q) und rechts Fragment AS 680-796 (PDB: 2KLE) .....	68
Abbildung 24: Aggregationszustand von PC2(680-796).....	69
Abbildung 25: 1D- <sup>1</sup> H -NOESY-Spektren von PC2(680-796) bei pH 7.5 im Verlauf der Titration mit CaCl <sub>2</sub> .....	71

Abbildung 26: $H^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine von PC2(680-796) bei pH 7.5 im Verlauf der Titration mit $CaCl_2$ .....	75
Abbildung 27: Gruppe 1 der $K_D$ -Werte: $\Delta I$ von F738/B $H^\delta$ (A), $\Delta I$ von Y762/B $H^\delta$ (B) und $\Delta\delta$ von H775/B $H^{\epsilon 1}$ (C) gegen die $CaCl_2$ -Konzentration aufgetragen und mit Formel 4 bzw. Formel 5 gefittet .....	77
Abbildung 28: Gruppe 2 der $K_D$ -Werte: $\Delta\delta$ von F759/A $H^\delta$ (A), $\Delta\delta$ von H773/A $H^{\epsilon 1}$ (B) und $\Delta\delta$ von H793/B $H^{\epsilon 1}$ (C) gegen die $CaCl_2$ -Konzentration aufgetragen und mit Formel 5 gefittet .....	78
Abbildung 29: Gruppe 3: $\Delta I$ von $H^\delta$ Y762/A gegen die $CaCl_2$ -Konzentration aufgetragen und mit Formel 4 gefittet.....	78
Abbildung 30: $1D$ - $^1H$ -NOESY-Spektren von PC2(680-796) mit 40.5 mM $CaCl_2$ in der Probe: Die $H^{\epsilon 1}$ -Signale der Histidine shiften mit steigendem pH. Das Signal von Y762 $H^\delta$ ist bei niedrigen pH-Werten aufgepalten. ....	80
Abbildung 31: Chemische Verschiebungen $\delta$ der Histidine gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet.....	83
Abbildung 32: Chemische Verschiebung $\delta$ von $H^{\delta 2}$ H750/A gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet.....	83
Abbildung 33: Chemische Verschiebung $\delta$ von $H^{\epsilon 1}$ H775/A gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 3 für zwei pK-Werte gefittet .....	84
Abbildung 34: Shifts von (A) F759/A $H^\delta$ und (B) Y762/A $H^\delta$ gegen den pH aufgetragen und mit Formel 2 gefittet.....	86
Abbildung 35: Shifts von (A) F738/B $H^\delta$ und (B) Y762/B $H^\delta$ gegen den pH aufgetragen und mit Formel 3 gefittet .....	87
Abbildung 36: $1D$ - $^1H$ -NOESY-Spektren von PC2(680-796) in Abwesenheit von $Ca^{2+}$ - Ionen in der Probe: Die $H^{\epsilon 1}$ - Signale der Histidine shiften mit steigendem pH-Wert in Richtung Hochfeld.....	89
Abbildung 37: Chemische Verschiebungen $\delta$ der Histidine gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet.....	90
Abbildung 38: Overlay-Darstellung der $^1H$ - $^{15}N$ -HSQC-Spektren von $^{15}N$ -PC2(717-792) bei verschiedenen Druckschritten .....	92
Abbildung 39: Diffusionsmessungen von $^{15}N$ -PC2(717-792) bei 1 MPa (links) und 250 MPa (rechts) .	94
Abbildung 40: Reduktion der beobachteten relativen hydrodynamischen Radii $R_H$ von $^{15}N$ -PC2(717-792) bei ansteigendem Druck .....	95
Abbildung 41: Kalziumfreisetzung an $^{15}N$ -PC2(717-792) unter Hochdruck.....	97
Abbildung 42: Lineare Volumenzunahme des Trissignals durch die Konzentrationserhöhung resultierend aus der Kompression der Pufferflüssigkeit .....	98
Abbildung 43: Random-coil korrigierte chemische Verschiebung $\delta$ von F738 $H^\delta$ bei steigendem Druck im $1D$ -NOESY-Spektrum. F738 $H^\delta$ dient als Markersignal für die Kalziumbindung.....	98
Abbildung 44: Lineare Abnahme des Integrals von F738 $H^\delta$ bei steigendem Druck. F738 $H^\delta$ dient als Markersignal für die Kalziumbindung .....	99

Abbildung 45: Linienbreite von F738 H <sup>δ</sup> bei steigendem Druck. F738 H <sup>δ</sup> dient als Markersignal für die Kalziumbindung .....	99
Abbildung 46: Kombinierte chemische Verschiebungsänderungen $\Delta\delta_{\text{comb}}$ der Aminosäuren R730, F738 und D739 aus EF1 gegen den Druck aufgetragen und mit Formel 21 gefittet .....	100
Abbildung 47: Kombinierte chemische Verschiebungsänderungen $\Delta\delta_{\text{comb}}$ der Aminosäuren Y762 (eine Aminosäure vor EF2), D763 und D767 aus EF2 gegen den Druck aufgetragen und mit Formel 21 gefittet .....	100
Abbildung 48: Betrag der Druckkoeffizienten $B_2^*$ der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale von <sup>15</sup> N-PC2(717-792) im HSQC-Spektrum .....	101
Abbildung 49: Druckkoeffizienten $B_2^*$ der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Aminosäuren von <sup>15</sup> N-PC2(717-792) geplottet auf die 3D-Struktur (PDB: 2Y4Q) .....	102
Abbildung 50: Konformationelle Änderungen von <sup>15</sup> N-PC2(717-792) unter Druckanwendung .....	104
Abbildung 51: Relative Diffusionskonstanten $1/R_H$ von <sup>15</sup> N-PC2(717-792) gegen den Druck aufgetragen und mit 3-Zustandsmodell gefittet .....	105
Abbildung 52: Volumenänderungen der Signale von <sup>15</sup> N-PC2(717-792) im HSQC-Spektrum bei 40 MPa im Vergleich zum Ausgangsspektrum bei 1 MPa .....	106
Abbildung 53: Volumenänderungen der Signale der Aminosäuren von <sup>15</sup> N-PC2(717-792) bei 40 MPa geplottet auf die 3D-Struktur PDB: 2Y4Q .....	107
Abbildung 54: HSQC-Spektrum von <sup>15</sup> N-PC2(680-796) .....	109
Abbildung 55: HSQC-Spektrum von <sup>15</sup> N-PC2(680-796) vergrößerter Ausschnitt .....	110
Abbildung 56: 1D- <sup>1</sup> H -NOESY-Spektrum von mDia1(69-451) .....	111
Abbildung 57: <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von (A) freiem <sup>15</sup> N-PC2(680-796) und (B) <sup>15</sup> N-PC2(680-796) im Komplex mit mDia1(69-451) bei fünffachem molaren Überschuss mDia1(69-451) in der Probe. ....	112
Abbildung 58: Überlagerung der <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N-HSQC-Spektren von freiem <sup>15</sup> N-PC2(680-796) [blau] und <sup>15</sup> N-PC2(680-796) im Komplex mit mDia1(69-451) bei fünffachem Überschuss mDia1(69-451) [rot] in der Probe. ....	113
Abbildung 59: Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale des <sup>15</sup> N-gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(680-796) zu mDia1(69-451)] .....	114
Abbildung 60: Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der identifizierten und verfolgbaren zweiten Zustände (bezeichnet als Zustände B) des <sup>15</sup> N-gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(680-796) zu mDia1(69-451)] .....	115
Abbildung 61: Volumenänderungen der Signale des <sup>15</sup> N-gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(680-796) zu mDia1(69-451)] .....	116
Abbildung 62: Volumenänderungen der Signale der identifizierten zweiten Zustände (bezeichnet als Zustände B) des <sup>15</sup> N-gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(680-796) zu mDia1(69-451)] .....	116

Abbildung 63: Überlagerungsdarstellung der Zustände A und B der Signale L703, D763, R730, Y762 und D767 von freiem [blau] $^{15}\text{N}$ -PC2(680-796) und bei fünffachem Überschuss mDia1(69-451) in der Probe [rot] .....	118
Abbildung 64: Änderungen der Signalvolumina der Zustände B von L703, R730 und D763 durch die mDia1-Zugabe .....	119
Abbildung 65: Kombinierte chemische Verschiebungsänderungen und Volumenänderungen von $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(680-796) im HSQC-Spektrum durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) sowie die Zusammenfassung der Effekte .....	121
Abbildung 66: Darstellung der Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderung und der Volumenänderungen der Signale von PC2(680-796) durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) auf der 3D-Struktur (PDB: 2Y4Q) .....	121
Abbildung 67: $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) .....	122
Abbildung 68: $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) vergrößerter Ausschnitt .....	123
Abbildung 69: $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von (A) freiem $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) [blau] und (B) $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) im Komplex mit mDia1(69-451) bei fünffachem Überschuss mDia1(69-451) [rot]. .....	124
Abbildung 70: (A) Überlagerung der $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von freiem $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) [blau] und $^{15}\text{N}$ -PC2(717-792) im Komplex mit mDia1(69-451) bei fünffachem Überschuss mDia1(69-451) [rot]. (B) Vergrößerter Ausschnitt .....	125
Abbildung 71: Beträge der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale des $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im HSQC-Spektrum durch die PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(717-792) zu mDia1(69-451)] .....	126
Abbildung 72: Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale von $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im HSQC-Spektrum durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) .....	127
Abbildung 73: Volumenänderungen der Signale des $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im HSQC-Spektrum durch die PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Komplexbildung beim Verhältnis 1:5 [PC2(717-792) zu mDia1(69-451)] .....	128
Abbildung 74: Schwankungen der Signalvolumina des $^{15}\text{N}$ -gelabelten PC2(717-792) im Verlauf der Titration mit mDia1 .....	129
Abbildung 75: Darstellung der Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderungen der Signale von PC2(717-792) durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) auf der 3D-Struktur von PC2(717-792), PDB-entry: 2Y4Q. ....	130
Abbildung 76: Kombinierte chemische Verschiebungsänderungen von H750 (links) und A757 (rechts) im Verlauf der Titration mit mDia1 .....	131
Abbildung 77: $K_D$ -Werte für die Interaktion von PC2(717-792) mit mDia1(69-451) .....	131
Abbildung 78: 1D- $^1\text{H}$ -NOESY-Spektren von PC2(720-797) bei pH 5.6 und steigender $\text{CaCl}_2$ -Konzentration .....	133
Abbildung 79: Integrale von F738 $\text{H}^\delta$ gegen die $\text{CaCl}_2$ -Konzentration aufgetragen und mit Formel 4 gefittet .....	134

Abbildung 80: 1D- <sup>1</sup> H -NOESY-Spektren von PC2(720-797) bei pH 6.8 und steigender CaCl <sub>2</sub> -Konzentration.....	135
Abbildung 81: Integrale von F738 H <sup>δ</sup> (links) und Y762 H <sup>δ</sup> (rechts) gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen und mit Formel 4 gefittet.....	136
Abbildung 82: 1D- <sup>1</sup> H -NOESY-Spektren von PC2(720-797) in Abwesenheit von Ca <sup>2+</sup> - Ionen in der Probe: Die H <sup>ε1</sup> - Signale der Histidine shiften mit steigendem pH.....	137
Abbildung 83: H <sup>ε1</sup> -Signale der Histidine von PC2(720-797) in Abwesenheit von Ca <sup>2+</sup> -Ionen gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet.....	138
Abbildung 84: 1D- <sup>1</sup> H -NOESY-Spektren von PC2(720-797) in Anwesenheit von Ca <sup>2+</sup> - Ionen in der Probe: Die H <sup>ε1</sup> - Signale der Histidine shiften mit steigendem pH.....	139
Abbildung 85: H750 H <sup>ε1</sup> von PC2(720-797) in Anwesenheit von Ca <sup>2+</sup> -Ionen gegen den pH-Wert aufgetragen und mit Formel 2 gefittet.....	140
Abbildung 86. Aggregationszustand von PC2(720-797) bei pH 5.6 (links), pH 7.8 (mitte) und pH 9.0 (rechts) in Abwesenheit von Kalzium .....	141
Abbildung 87. Aggregationszustand von PC2(720-797) bei pH 5.6 (links), pH 7.8 (mitte) und pH 9.0 (rechts) in Anwesenheit von Kalzium .....	142
Abbildung 88: C-Terminus von Polycystin-2.....	145
Abbildung 89: Darstellung der Aminosäuren im Verlauf der Kalziumtitration der verfolgten Signale auf der 3D-Struktur (PDB: 2Y4Q) .....	148
Abbildung 90: Relative Populationen der konformationellen Zustände von PC2(717-792) .....	153
Abbildung 91: Cartoondarstellung (links) und Oberflächendarstellung (rechts) der Head-to-Tail Dimerstruktur von Calmodulin im Komplex mit der Calmodulin-Bindedomäne der Phosphatase Calcineurin (PDB: 2R28).....	154
Abbildung 92: A) Überlagerungsdarstellung von PC2(717-792), PDB: 2Y4Q (grün) mit C-terminalem EF-Hand-Paar von Calmodulin, PDB: 2R28 (rot). B) Oberflächendarstellung von A. C) Konformationelle Änderungen bei PC2(717-792) unter Hochdruck .....	155
Abbildung 93: Darstellung der Effekte der kombinierten chemischen Verschiebungsänderung und der Volumenänderungen der Signale von A) PC2(680-796) und B) PC2(717-792) durch die Komplexbildung mit mDia1(69-451) auf der 3D-Struktur (PDB: 2Y4Q) .....	158

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme.....	35
Tabelle 2: Antibiotikaverwendung und IPTG-Konzentrationen für die Expression.....	43
Tabelle 3: Proteinkonzentrationen und -verhältnisse bei der PC2(680-796)-mDia1(69-451)-Titration.....	57
Tabelle 4: Proteinkonzentrationen und -verhältnisse bei der PC2(717-792)-mDia1(69-451)-Titration.....	58
Tabelle 5: Verwendete Pulsprogramme.....	63
Tabelle 6: Populationen und chemische Verschiebungen $\delta$ der Signale von PC2(680-796) im 1D- $^1\text{H}$ - NOESY-Spektrum .....	68
Tabelle 7: Scheinbare Molekülmassen und relativer hydrodynamischer Radius von PC2(680-796) in Anwesenheit von 10 mM $\text{CaCl}_2$ . .....	69
Tabelle 8: Bestätigung der pH-Stabilität anhand der chemischen Verschiebung $\delta$ [ppm] des Trissignals im Verlauf der Titration mit $\text{CaCl}_2$ .....	70
Tabelle 9: Populationen der Signale $\text{H}^\delta$ Y762/A und B, $\text{H}^\epsilon$ Y762/A und B sowie $\text{H}^\delta$ F738/B und $\text{H}^\delta$ F759/A im Verlauf der Titration mit $\text{CaCl}_2$ bei Referenzierung auf das Integral von Y684 $\text{H}^\epsilon$ . In Klammern werden die Werte für nicht eindeutig auswertbare Titrationsschritte angezeigt .....	73
Tabelle 10: Chemische Verschiebung $\delta$ [ppm] der Signale $\text{H}^\delta$ Y762/A und B, $\text{H}^\epsilon$ Y762/A und B sowie $\text{H}^\delta$ F738/B und $\text{H}^\delta$ F759/A im Verlauf der Titration mit $\text{CaCl}_2$ . Kennzeichnung mit „-“ für Schritte, bei denen das Signal noch nicht detektierbar war.....	73
Tabelle 11: Populationen der Signale fünf Histidine in ihren Zuständen im Verlauf der Titration mit $\text{CaCl}_2$ bei Referenzierung auf das Integral von Y684 $\text{H}^\epsilon$ .....	76
Tabelle 12: Chemische Verschiebung $\delta$ [ppm] der Signale der fünf Histidine in ihren Zuständen im Verlauf der Titration mit $\text{CaCl}_2$ .....	76
Tabelle 13: Gruppe 1 der $K_D$ -Werte: Berechnung der $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.....	77
Tabelle 14: Gruppe 2 der $K_D$ -Werte: Berechnung der $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.....	78
Tabelle 15: Gruppe 3 der $K_D$ -Werte: Berechnung der $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.....	78
Tabelle 16: Berechnung der $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit dem Modell für 3 Bindungsplätze .....	79
Tabelle 17: Populationen der Histidine im Verlauf der pH-Titration .....	82
Tabelle 18: Chemische Verschiebungen $\delta$ der $\text{H}^{\epsilon 1}$ - bzw. der $\text{H}^{\delta 2}$ -Signale der Histidine im Verlauf der pH-Titration .....	82
Tabelle 19: pK-Werte der Histidine von PC2(680-796) in Anwesenheit von $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen.....	84
Tabelle 20: Populationen von Y762/A $\text{H}^\delta$ und B, F738 $\text{H}^\delta$ im Verlauf der pH-Titration.....	85
Tabelle 21: Chemische Verschiebungen von $\text{H}^\delta$ von Y762/A und B sowie F738 $\text{H}^\delta$ und F759/A $\text{H}^\delta$ .....	86
Tabelle 22: pK-Werte für F759/A $\text{H}^\delta$ und Y762/A $\text{H}^\delta$ .....	86
Tabelle 23: pK-Werte für F738/B $\text{H}^\delta$ und Y762/B $\text{H}^\delta$ .....	87
Tabelle 24: Chemische Verschiebungen der $\text{H}^{\epsilon 1}$ - Signale der Histidine im Verlauf der pH-Titration ...	90



Tabelle 25: Populationen der $H^{\epsilon 1}$ - Signale der Histidine im Verlauf der pH-Titration.....	90
Tabelle 26: pK-Werte der der Histidine von PC2(680-796) in Abwesenheit von $Ca^{2+}$ - Ionen.....	91
Tabelle 27: Das Integral des $CH_3$ -Bereichs von $^{15}N$ -PC2(717-792) bleibt im Verlauf der Druckreihe konstant.....	93
Tabelle 28: Scheinbare Molekülmassen und relative hydrodynamische Radii von $^{15}N$ -PC2(717-792) unter Druck in Anwesenheit von 10 mM $CaCl_2$ in der Probe .....	94
Tabelle 29: Ergebnisse des 3-Zustandsmodells im schnellen Austausch.....	103
Tabelle 30: Mit 3-Zustandsmodell aus Formel 25 berechnete relative Diffusionskonstanten $1/R_H$ , relative hydrodynamische Radii und scheinbare Molekülmassen für die drei Zustände von $^{15}N$ -PC2(717-792) bei Normaldruck .....	105
Tabelle 31: Populationen A und B für Aminosäuren mit identifizierten zweiten Zuständen .....	117
Tabelle 32: $K_D$ -Werte für die Interaktion von PC2(680-796) mit mDia1(69-451).....	119
Tabelle 33: $K_D$ -Wert von PC2(720-797) für $Ca^{2+}$ -Ionen bei pH 5,6 .....	134
Tabelle 34: $K_D$ -Werte von PC2(720-797) für $Ca^{2+}$ -Ionen bei pH 6.8 .....	136
Tabelle 35: Integrale der Aminosäuren F738 $H^{\delta}$ und Y762 $H^{\delta}$ bei 33.9 mM $CaCl_2$ in der Probe .....	136
Tabelle 36: Verhältnis der Populationen von $H^{\delta}$ Y762/A und B bei 33.9 mM $CaCl_2$ .....	136
Tabelle 37: pK-Werte der Histidine von PC2(720-797) in Abwesenheit von $Ca^{2+}$ -Ionen .....	138
Tabelle 38: pK-Wert des Histidins $H^{\epsilon 1}$ H750 von PC2(720-797) in Anwesenheit von $Ca^{2+}$ - Ionen.....	140
Tabelle 39: Scheinbare Molekülmassen und relative hydrodynamische Radii von PC2(720-797) in Abwesenheit $CaCl_2$ bei verschiedenen pH-Werten .....	141
Tabelle 40: Scheinbare Molekülmassen und relative hydrodynamische Radii von PC2(720-797) in Anwesenheit $CaCl_2$ bei verschiedenen pH-Werten. ....	142
Tabelle 41: Polymerzustand von PC2(720-797) in An- und Abwesenheit Kalziumionen bei verschiedenen pH-Werten. ....	143
Tabelle 42: Gruppen der $K_D$ -Werte: Berechnung der $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für $Ca^{2+}$ -Ionen ....	147
Tabelle 43: Berechnung der $K_D$ -Werte von PC2(680-796) für $Ca^{2+}$ -Ionen mit dem Modell für 3 Bindungsplätze .....	147
Tabelle 44: Ergebnisse des 3-Zustandsmodells im schnellen Austausch (3.5.7, Formel 21) .....	152
Tabelle 45: Chemische Verschiebungen [ppm] der Aminosäuren von PC2(717-792) unter Hochdruck .....	184
Tabelle 46: Chemische Verschiebungen [ppm] der Aminosäuren von PC2(680-796) für 60 $\mu M$ PC2(680-796) ohne und mit 300 $\mu M$ mDia1(69-451) in der Probe.....	202
Tabelle 47: Chemische Verschiebungen der identifizierten zweiten Zustände von PC2(680-796) ohne mDia1 in der Probe.....	203
Tabelle 48: Populationsverhältnisse bei Aminosäuren mit identifizierten zweiten Zuständen von PC2(680-796) .....	203

Tabelle 49: Chemische Verschiebungen [ppm] der Aminosäuren von PC2(717-792) bei 60 $\mu$ M	
PC2(717-792) ohne und mit 300 $\mu$ M mDia1(69-451) in der Probe.....	205

### 6.3 Literaturverzeichnis:

- A. Bax, D.G. Davis, 1985. Practical Aspects of Two-Dimensional Transverse NOE Spectroscopy [WWW Document]. URL <http://spin.niddk.nih.gov/bax/lit/508/52.pdf> (accessed 6.20.16).
- Akasaka, K., Matsuki, H., 2015. High Pressure Bioscience. Springer.
- Alberts, A.S., 2001. Identification of a Carboxyl-terminal Diaphanous-related Formin Homology Protein Autoregulatory Domain. *J. Biol. Chem.* 276, 2824–2830. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006205200>
- Allen, M.D., Qamar, S., Vadivelu, M.K., Sandford, R.N., Bycroft, M., 2014. A high-resolution structure of the EF-hand domain of human polycystin-2. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 23, 1301–1308. <https://doi.org/10.1002/pro.2513>
- Anyatonwu, G.I., Estrada, M., Tian, X., Somlo, S., Ehrlich, B.E., 2007. Regulation of ryanodine receptor-dependent calcium signaling by polycystin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6454–6459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610324104>
- Arnold, M.R., Kalbitzer, H.R., Kremer, W., 2003. High-sensitivity sapphire cells for high pressure NMR spectroscopy on proteins.
- Arnold, M.R., Kremer, W., Lüdemann, H.-D., Kalbitzer, H.R., 2002. <sup>1</sup>H-NMR parameters of common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides Gly-Gly-X-Ala at pressures between 0.1 and 200 MPa. *Biophys. Chem.* 96, 129–140. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(02\)00018-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(02)00018-2)
- Bai, C.-X., Kim, S., Li, W.-P., Streets, A.J., Ong, A.C.M., Tsiokas, L., 2008. Activation of TRPP2 through mDia1-dependent voltage gating. *EMBO J.* 27, 1345–1356. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.70>
- Belibi, F.A., Edelstein, C.L., 2010. Novel targets for the treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Expert Opin. Investig. Drugs* 19, 315–328. <https://doi.org/10.1517/13543781003588491>
- Bertani, G., 1951. STUDIES ON LYSOGENESIS I. *J. Bacteriol.* 62, 293–300.
- Brasier, J.L., Henske, E.P., 1997. Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 99, 194–199.
- Breitsprecher, D., Goode, B.L., 2013. Formins at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 1–7. <https://doi.org/10.1242/jcs.107250>
- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J., Huber, R., 1995. High-level Biosynthetic Substitution of Methionine in Proteins by its Analogs 2-Aminohexanoic Acid, Selenomethionine, Telluromethionine and Ethionine in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 230, 788–796. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0788h.x>
- Cai, Y., Maeda, Y., Cedzich, A., Torres, V.E., Wu, G., Hayashi, T., Mochizuki, T., Park, J.H., Witzgall, R., Somlo, S., 1999. Identification and Characterization of Polycystin-2, the PKD2 Gene Product. *J. Biol. Chem.* 274, 28557–28565. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.40.28557>
- Cantero, M. del R., Cantiello, H.F., 2015. Polycystin-2 (TRPP2) Regulation by Ca<sup>2+</sup> Is Effected and Diversified by Actin-Binding Proteins. *Biophys. J.* 108, 2191–2200. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.050>
- Cantiello, H.F., 2004. Regulation of calcium signaling by polycystin-2. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 286, F1012–F1029. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00181.2003>

- Ćelić, A., Petri, E.T., Demeler, B., Ehrlich, B.E., Boggon, T.J., 2008. Domain Mapping of the Polycystin-2 C-terminal Tail Using de Novo Molecular Modeling and Biophysical Analysis. *J. Biol. Chem.* 283, 28305–28312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802743200>
- Ćelić, A.S., Petri, E.T., Benbow, J., Hodsdon, M.E., Ehrlich, B.E., Boggon, T.J., 2012. Calcium-induced Conformational Changes in C-terminal Tail of Polycystin-2 Are Necessary for Channel Gating. *J. Biol. Chem.* 287, 17232–17240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.354613>
- Chen, X.-Z., Segal, Y., Basora, N., Guo, L., Peng, J.-B., Babakhanlou, H., Vassilev, P.M., Brown, E.M., Hediger, M.A., Zhou, J., 2001. Transport Function of the Naturally Occurring Pathogenic Polycystin-2 Mutant, R742X. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1251–1256. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4720>
- Chesarone, M.A., DuPage, A.G., Goode, B.L., 2010. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 62–74. <https://doi.org/10.1038/nrm2816>
- Davenport, J.R., Yoder, B.K., 2005. An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 289, F1159–F1169. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00118.2005>
- Davis, A.L., Keeler, J., Laue, E.D., Moskau, D., 1992. Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients. *J. Magn. Reson.* 1969 98, 207–216. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(92\)90126-R](https://doi.org/10.1016/0022-2364(92)90126-R)
- Delling, M., DeCaen, P.G., Doerner, J.F., Febvay, S., Clapham, D.E., 2013. Primary cilia are specialized calcium signaling organelles. *Nature* 504, 311–314. <https://doi.org/10.1038/nature12833>
- Delmas, P., Nauli, S.M., Li, X., Coste, B., Osorio, N., Crest, M., Brown, D.A., Zhou, J., 2004. Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells. *FASEB J.* <https://doi.org/10.1096/fj.03-0319fje>
- Du, J., Ding, M., Sours-Brothers, S., Graham, S., Ma, R., 2008. Mediation of angiotensin II-induced Ca<sup>2+</sup> signaling by polycystin 2 in glomerular mesangial cells. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 294, F909–F918. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00606.2007>
- Eberhardt, M., 2011. Strukturelle und biochemische Charakterisierung des cytosolischen C-Terminus von Polycystin-2 und seine Interaktion mit dem Zytoskelett-assoziierten Protein mammalian diaphanous homolog 1. Dissertation, Universität Regensburg.
- Fedeles, S.V., Gallagher, A.-R., Somlo, S., 2014. Polycystin-1: a master regulator of intersecting cystic pathways. *Trends Mol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.01.004>
- Fogelgren, B., Lin, S.-Y., Zuo, X., Jaffe, K.M., Park, K.M., Reichert, R.J., Bell, P.D., Burdine, R.D., Lipschutz, J.H., 2011. The Exocyst Protein Sec10 Interacts with Polycystin-2 and Knockdown Causes PKD-Phenotypes. *PLoS Genet.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001361>
- Foggensteiner, L., Bevan, A.P., Thomas, R., Coleman, N., Boulter, C., Bradley, J., Ibraghimov-Beskrovnaia, O., Klinger, K., Sandford, R., 2000. Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 11, 814–827.
- Gallagher, A.R., Cedzich, A., Gretz, N., Somlo, S., Witzgall, R., 2000. The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 4017–4022.
- Geng, L., Boehmerle, W., Maeda, Y., Okuhara, D.Y., Tian, X., Yu, Z., Choe, C., Anyatonwu, G.I., Ehrlich, B.E., Somlo, S., 2008. Syntaxin 5 regulates the endoplasmic reticulum channel-release properties of polycystin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15920–15925. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805062105>

- Geng, L., Okuhara, D., Yu, Z., Tian, X., Cai, Y., Shibasaki, S., Somlo, S., 2006. Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *J. Cell Sci.* 119, 1383–1395. <https://doi.org/10.1242/jcs.02818>
- Geng, L., Segal, Y., Pavlova, A., Barros, E.J., Löhning, C., Lu, W., Nigam, S.K., Frischauf, A.M., Reeders, S.T., Zhou, J., 1997. Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am. J. Physiol.* 272, F451–459.
- Geng, L., Segal, Y., Peissel, B., Deng, N., Pei, Y., Carone, F., Rennke, H.G., Glücksmann-Kuis, A.M., Schneider, M.C., Ericsson, M., Reeders, S.T., Zhou, J., 1996. Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J. Clin. Invest.* 98, 2674–2682.
- Giamarchi, A., Feng, S., Rodat-Despoix, L., Xu, Y., Bubenshchikova, E., Newby, L.J., Hao, J., Gaudioso, C., Crest, M., Lupas, A.N., Honore, E., Williamson, M.P., Obara, T., Ong, A.C., Delmas, P., 2010. A polycystin-2 (TRPP2) dimerization domain essential for the function of heteromeric polycystin complexes. *EMBO J.* 29, 1176–1191. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.18>
- Gill, S.C., von Hippel, P.H., 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319–326.
- Goode, B.L., Eck, M.J., 2007. Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 593–627. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647>
- Grantham, J., Cook, L., Torres, V., Bost, J., Chapman, A., Harris, P., Guay-Woodford, L., Bae, K., 2008. Determinants of renal volume in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 73, 108–116. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002624>
- Grieben, M., Pike, A.C.W., Shintre, C.A., Venturi, E., El-Ajouz, S., Tessitore, A., Shrestha, L., Mukhopadhyay, S., Mahajan, P., Chalk, R., Burgess-Brown, N.A., Sitsapesan, R., Huiskonen, J.T., Carpenter, E.P., 2016. Structure of the polycystic kidney disease TRP channel Polycystin-2 (PC2). *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, nsmb.3343. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3343>
- Griffin, M.D., Torres, V.E., Grande, J.P., Kumar, R., 1997. Vascular expression of polycystin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 616–626.
- Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Piontek, K., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., Guggino, W.B., Germino, G.G., 2000. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408, 990–994. <https://doi.org/10.1038/35050128>
- Harris, P.C., Torres, V.E., 2009. Polycystic Kidney Disease. *Annu. Rev. Med.* 60, 321–337. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.101707.125712>
- Hausser, K.H., Kalbitzer, H.R., 1991. NMR in Medicine and Biology. Structure Determination, Tomography, In Vivo Spectroscopy.
- Hidaka, S., Könecke, V., Osten, L., Witzgall, R., 2004. PIGEA-14, a Novel Coiled-coil Protein Affecting the Intracellular Distribution of Polycystin-2. *J. Biol. Chem.* 279, 35009–35016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314206200>
- Higgs, H.N., 2005. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.*, SPECIAL ISSUE: CELEBRATING 50 YEARS OF THE IUBMB 30, 342–353. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.04.014>
- Huang, L., Lipschutz, J.H., 2014. Cilia and polycystic kidney disease, kith and kin. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 102, 174–185. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21066>
- Hughes, J., Ward, C.J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millán, J.L., Gamble, V., Harris, P.C., 1995. The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat. Genet.* 10, 151–160. <https://doi.org/10.1038/ng0695-151>

- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Dackowski, W.R., Foggensteiner, L., Coleman, N., Thiru, S., Petry, L.R., Burn, T.C., Connors, T.D., Van Raay, T., Bradley, J., Qian, F., Onuchic, L.F., Watnick, T.J., Piontek, K., Hakim, R.M., Landes, G.M., Germino, G.G., Sandford, R., Klinger, K.W., 1997. Polycystin: In vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6397–6402.
- Irazabal, M.V., Huston, J., Kubly, V., Rossetti, S., Sundsbak, J.L., Hogan, M.C., Harris, P.C., Brown, R.D., Torres, V.E., 2011. Extended Follow-Up of Unruptured Intracranial Aneurysms Detected by Presymptomatic Screening in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 1274–1285. <https://doi.org/10.2215/CJN.09731110>
- Johnson Jr., C.S., 1999. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications.
- Jurczyk, A., Gromley, A., Redick, S., Agustin, J.S., Witman, G., Pazour, G.J., Peters, D.J.M., Doxsey, S., 2004. Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *J. Cell Biol.* 166, 637–643. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405023>
- Kachel, N., Erdmann, K.S., Kremer, W., Wolff, P., Gronwald, W., Heumann, R., Kalbitzer, H.R., 2003. Structure Determination and Ligand Interactions of the PDZ2b Domain of PTP-Bas (hPTP1E): Splicing-induced Modulation of Ligand Specificity. *J. Mol. Biol.* 334, 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.026>
- Kachel, N., Kremer, W., Zahn, R., Kalbitzer, H.R., 2006. Observation of intermediate states of the human prion protein by high pressure NMR spectroscopy. *BMC Struct. Biol.* 6, 16. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-6-16>
- Kalbitzer, H.R., Rosnizeck, I.C., Munte, C.E., Narayanan, S.P., Kropf, V., Spoerner, M., 2013. Intrinsic Allosteric Inhibition of Signaling Proteins by Targeting Rare Interaction States Detected by High-Pressure NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 14242–14246. <https://doi.org/10.1002/anie.201305741>
- Kato, T., Watanabe, N., Morishima, Y., Fujita, A., Ishizaki, T., Narumiya, S., 2001. Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J. Cell Sci.* 114, 775–784.
- Kay, L., Keifer, P., Saarinen, T., 1992. Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10663–10665. <https://doi.org/10.1021/ja00052a088>
- Kim, I., Li, C., Liang, D., Chen, X.-Z., Coffy, R.J., Ma, J., Zhao, P., Wu, G., 2008. Polycystin-2 Expression Is Regulated by a PC2-binding Domain in the Intracellular Portion of Fibrocystin. *J. Biol. Chem.* 283, 31559–31566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805452200>
- Kiviharju, T.M., Lecane, P.S., Sellers, R.G., Peehl, D.M., 2002. Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 2666–2674.
- Koehler, J., Beck Erlach, M., Crusca, E., Kremer, W., Munte, C.E., Kalbitzer, H.R., 2012. Pressure Dependence of <sup>15</sup>N Chemical Shifts in Model Peptides Ac-Gly-Gly-X-Ala-NH<sub>2</sub>. *Materials* 5, 1774–1786. <https://doi.org/10.3390/ma5101774>
- Kottgen, M., Benzing, T., Simmen, T., Tauber, R., Buchholz, B., Feliciangeli, S., Huber, T.B., Schermer, B., Kramer-Zucker, A., Hopker, K., Simmen, K.C., Tschucke, C.C., Sandford, R., Kim, E., Thomas, G., Walz, G., 2005. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J.* 24, 705–716. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600566>

- Kottgen, M., Buchholz, B., Garcia-Gonzalez, M.A., Kotsis, F., Fu, X., Doerken, M., Boehlke, C., Steffl, D., Tauber, R., Wegierski, T., Nitschke, R., Suzuki, M., Kramer-Zucker, A., Germino, G.G., Watnick, T., Prenen, J., Nilius, B., Kuehn, E.W., Walz, G., 2008. TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex. *J. Cell Biol.* 182, 437–447. <https://doi.org/10.1083/jcb.200805124>
- Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B.E., Somlo, S., 2002. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell Biol.* 4, 191–197. <https://doi.org/10.1038/ncb754>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lafitte, D., Heck, A.J., Hill, T.J., Jumel, K., Harding, S.E., Derrick, P.J., 1999. Evidence of noncovalent dimerization of calmodulin. *Eur. J. Biochem.* 261, 337–344.
- Larsson, G., Schleucher, J., Onions, J., Hermann, S., Grundström, T., Wijmenga, S.S., 2005. Backbone Dynamics of a Symmetric Calmodulin Dimer in Complex with the Calmodulin-Binding Domain of the Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor SEF2-1/E2-2: A Highly Dynamic Complex. *Biophys. J.* 89, 1214–1226. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.055780>
- Lehtonen, S., Ora, A., Olkkonen, V.M., Geng, L., Zerial, M., Somlo, S., Lehtonen, E., 2000. In Vivo Interaction of the Adapter Protein CD2-associated Protein with the Type 2 Polycystic Kidney Disease Protein, Polycystin-2. *J. Biol. Chem.* 275, 32888–32893.
- Lehtonen, S., Zhao, F., Lehtonen, E., 2002. CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 283, F734–F743. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00312.2001>
- Leuenroth, S.J., Bencivenga, N., Igarashi, P., Somlo, S., Crews, C.M., 2008. Triptolide Reduces Cystogenesis in a Model of ADPKD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 19, 1659–1662. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008030259>
- Li, A., Tian, X., Sung, S.-W., Somlo, S., 2003. Identification of two novel polycystic kidney disease-1-like genes in human and mouse genomes. *Genomics* 81, 596–608. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(03\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(03)00048-X)
- Li, Q., Dai, Y., Guo, L., Liu, Y., Hao, C., Wu, G., Basora, N., Michalak, M., Chen, X.-Z., 2003a. Polycystin-2 Associates with Tropomyosin-1, an Actin Microfilament Component. *J. Mol. Biol.* 325, 949–962. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)01333-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)01333-5)
- Li, Q., Liu, Y., Shen, P.Y., Dai, X.-Q., Wang, S., Smillie, L.B., Sandford, R., Chen, X.-Z., 2003b. Troponin I Binds Polycystin-I and Inhibits Its Calcium-Induced Channel Activation†. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 7618–7625. <https://doi.org/10.1021/bi034210a>
- Li, Q., Shen, P.Y., Wu, G., Chen, X.-Z., 2003c. Polycystin-2 Interacts with Troponin I, an Angiogenesis Inhibitor†. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 450–457. <https://doi.org/10.1021/bi0267792>
- Li, X., Luo, Y., Starremans, P.G., McNamara, C.A., Pei, Y., Zhou, J., 2005. Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix–loop–helix inhibitor Id2. *Nat. Cell Biol.* 7, 1202–1212. <https://doi.org/10.1038/ncb1326>
- Li, X., Magenheimer, B.S., Xia, S., Johnson, T., Wallace, D.P., Calvet, J.P., Li, R., 2008. A Tumor Necrosis Factor-Alpha-Mediated Pathway Promoting Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Nat. Med.* 14, 863–868. <https://doi.org/10.1038/nm1783>
- Li, Y., Wright, J.M., Qian, F., Germino, G.G., Guggino, W.B., 2005. Polycystin 2 Interacts with Type I Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor to Modulate Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling. *J. Biol. Chem.* 280, 41298–41306. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510082200>

- Liang, G., Li, Q., Tang, Y., Kokame, K., Kikuchi, T., Wu, G., Chen, X.-Z., 2008a. Polycystin-2 is regulated by endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum. Mol. Genet.* 17, 1109–1119. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm383>
- Liang, G., Yang, J., Wang, Z., Li, Q., Tang, Y., Chen, X.-Z., 2008b. Polycystin-2 down-regulates cell proliferation via promoting PERK-dependent phosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *Hum. Mol. Genet.* 17, 3254–3262. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn221>
- Liu, M.L., Mao, X.A., Ye, C.H., Huang, H., Nicholson, J.K., Lindon, J.C., 1998. Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 132, 125–129. <https://doi.org/10.1006/jmre.1998.1405>
- Luo, Y., Vassilev, P.M., Li, X., Kawanabe, Y., Zhou, J., 2003. Native Polycystin 2 Functions as a Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-Permeable Cation Channel in Renal Epithelia. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2600–2607. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2600-2607.2003>
- Ma, R., Li, W.-P., Rundle, D., Kong, J., Akbarali, H.I., Tsiokas, L., 2005. PKD2 Functions as an Epidermal Growth Factor-Activated Plasma Membrane Channel. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8285–8298. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.18.8285-8298.2005>
- Maiti, S., Michelot, A., Gould, C., Blanchoin, L., Sokolova, O., Goode, B.L., 2012. Structure and activity of full-length formin mDia1. *Cytoskeleton*. Hoboken NJ 69, 393–405. <https://doi.org/10.1002/cm.21033>
- Markley, J.L., 1975. Correlation proton magnetic resonance studies at 250 MHz of bovine pancreatic ribonuclease. I. Reinvestigation of the histidine peak assignments. *Biochemistry (Mosc.)* 14, 3546–3554.
- Markowitz, G.S., Cai, Y., Li, L., Wu, G., Ward, L.C., Somlo, S., D'Agati, V.D., 1999. Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am. J. Physiol.* 277, F17–25.
- Mochizuki, T., Tsuchiya, K., Nitta, K., 2013. Autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances in pathogenesis and potential therapies. *Clin. Exp. Nephrol.* 17, 317–326. <https://doi.org/10.1007/s10157-012-0741-0>
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., Kimberling, W.J., Breuning, M.H., Deltas, C.C., Peters, D.J., Somlo, S., 1996. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339–1342.
- Montell, C., 2005. The TRP Superfamily of Cation Channels. *Sci. Signal.* 2005, re3–re3. <https://doi.org/10.1126/stke.2722005re3>
- Munte, C.E., Gäde, G., Domogalla, B., Kremer, W., Kellner, R., Kalbitzer, H.R., 2008. C-mannosylation in the hypertrehalosaemic hormone from the stick insect *Carausius morosus*. *FEBS J.* 275, 1163–1173. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06277.x>
- Nauli, S.M., Alenghat, F.J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E.H., Lu, W., Brown, E.M., Quinn, S.J., Ingber, D.E., Zhou, J., 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat. Genet.* 33, 129–137. <https://doi.org/10.1038/ng1076>
- Newby, L.J., Streets, A.J., Zhao, Y., Harris, P.C., Ward, C.J., Ong, A.C.M., 2002. Identification, Characterization, and Localization of a Novel Kidney Polycystin-1-Polycystin-2 Complex. *J. Biol. Chem.* 277, 20763–20773.
- Nilius, B., 2007. TRP channels in disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1772, 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.02.002>
- Nims, N., Vassmer, D., Maser, R.L., 2003. Transmembrane Domain Analysis of Polycystin-1, the Product of the Polycystic Kidney Disease-1 (PKD1) Gene: Evidence for 11 Membrane-



- Spanning Domains†. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 13035–13048.  
<https://doi.org/10.1021/bi035074c>
- Nishio, S., Hatano, M., Nagata, M., Horie, S., Koike, T., Tokuhisa, T., Mochizuki, T., 2005. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. *J. Clin. Invest.* 115, 910–918. <https://doi.org/10.1172/JCI200522850>
- Obermüller, N., Gallagher, A.R., Cai, Y., Gassler, N., Gretz, N., Somlo, S., Witzgall, R., 1999. The rat pkd2 protein assumes distinct subcellular distributions in different organs. *Am. J. Physiol.* 277, F914–925.
- Ong, A.C., Harris, P.C., Davies, D.R., Pritchard, L., Rossetti, S., Biddolph, S., Vaux, D.J., Migone, N., Ward, C.J., 1999. Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int.* 56, 1324–1333. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00659.x>
- Owsianik, G., Talavera, K., Voets, T., Nilius, B., 2006. Permeation and Selectivity of Trp Channels. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 685–717. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406>
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T., 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 4, 2411–2423.
- Palmer, A., Cavanagh, J., Wright, P., Rance, M., 1991. Sensitivity improvement in proton-detected two-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 1969 93, 151–170. [https://doi.org/10.1016/0022-2364\(91\)90036-s](https://doi.org/10.1016/0022-2364(91)90036-s)
- Pazour, G.J., San Agustin, J.T., Follit, J.A., Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., 2002. Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease. *Curr. Biol.* 12, R378–R380. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00877-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00877-1)
- Pelta, M.D., Morris, G.A., Stchedroff, M.J., Hammond, S.J., 2002. A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 40, S147–S152. <https://doi.org/10.1002/mrc.1107>
- Petri, E.T., Čelić, A., Kennedy, S.D., Ehrlich, B.E., Boggan, T.J., Hodsdon, M.E., 2010. Structure of the EF-hand domain of polycystin-2 suggests a mechanism for Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of polycystin-2 channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 9176–9181. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912295107>
- Praetorius, H.A., Spring, K.R., 2003. The renal cell primary cilium functions as a flow sensor. [Miscellaneous Article]. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* Sept. 2003 12, 517–520.
- Qian, F., Germino, F.J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., Germino, G.G., 1997. PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat. Genet.* 16, 179–183. <https://doi.org/10.1038/ng0697-179>
- Qin, H., Burnette, D.T., Bae, Y.-K., Forscher, P., Barr, M.M., Rosenbaum, J.L., 2005. Intraflagellar Transport Is Required for the Vectorial Movement of TRPV Channels in the Ciliary Membrane. *Curr. Biol.* 15, 1695–1699. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.08.047>
- Raychowdhury, M.K., McLaughlin, M., Ramos, A.J., Montalbetti, N., Bouley, R., Ausiello, D.A., Cantiello, H.F., 2005. Characterization of Single Channel Currents from Primary Cilia of Renal Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 34718–34722. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507793200>
- Rose, R., Weyand, M., Lammers, M., Ishizaki, T., Ahmadian, M.R., Wittinghofer, A., 2005. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* 435, 513–518. <https://doi.org/10.1038/nature03604>
- Rosenbaum, J.L., Witman, G.B., 2002. Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 813–825. <https://doi.org/10.1038/nrm952>

- Rossetti, S., Consugar, M.B., Chapman, A.B., Torres, V.E., Guay-Woodford, L.M., Grantham, J.J., Bennett, W.M., Meyers, C.M., Walker, D.L., Bae, K., Zhang, Q. (Jean), Thompson, P.A., Miller, J.P., Harris, P.C., 2007. Comprehensive Molecular Diagnostics in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2143–2160. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006121387>
- Rundle, D.R., Gorbsky, G., Tsiokas, L., 2004. PKD2 Interacts and Co-localizes with mDia1 to Mitotic Spindles of Dividing Cells ROLE OF mDia1 IN PKD2 LOCALIZATION TO MITOTIC SPINDLES. *J. Biol. Chem.* 279, 29728–29739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400544200>
- Sammels, E., Devogelaere, B., Mekahli, D., Bultynck, G., Missiaen, L., Parys, J.B., Cai, Y., Somlo, S., De Smedt, H., 2010. Polycystin-2 Activation by Inositol 1,4,5-Trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> Release Requires Its Direct Association with the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor in a Signaling Microdomain. *J. Biol. Chem.* 285, 18794–18805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090662>
- Schägger, H., 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379.
- Schleucher, J., Schwendinger, M., Sattler, M., Schmidt, P., Schedletzky, O., Glaser, S.J., Sørensen, O.W., Griesinger, C., 1994. A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients. *J. Biomol. NMR* 4, 301–306.
- Schumann, F., 2007. Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein–protein interactions.
- Schumann, Hoffmeister, H., Bader, R., Schmidt, M., Witzgall, R., Kalbitzer, H.R., 2009a. Ca<sup>2+</sup>-dependent Conformational Changes in a C-terminal Cytosolic Domain of Polycystin-2. *J. Biol. Chem.* 284, 24372–24383. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025635>
- Schumann, Hoffmeister, H., Schmidt, M., Bader, R., Besl, E., Witzgall, R., Kalbitzer, H.R., 2009b. NMR-assignments of a cytosolic domain of the C-terminus of polycystin-2. *Biomol. NMR Assign.* 3, 141–144. <https://doi.org/10.1007/s12104-009-9160-x>
- Shen, P.S., Liu, P.G.D., Xiaowen, Clapham, D.B., David E., Cao, E., Xiaoyong Yang, 2016. The Structure of the Polycystic Kidney Disease Channel PKD2 in Lipid Nanodiscs.
- Shimada, A., Nyitrai, M., Vetter, I.R., Kühlmann, D., Bugyi, B., Narumiya, S., Geeves, M.A., Wittinghofer, A., 2004. The Core FH2 Domain of Diaphanous-Related Formins Is an Elongated Actin Binding Protein that Inhibits Polymerization. *Mol. Cell* 13, 511–522. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00059-0)
- Stoscheck, C.M., 1990. [6] Quantitation of protein, in: Deutscher, M.P. (Ed.), *Methods in Enzymology, Guide to Protein Purification*. Academic Press, pp. 50–68.
- Streets, A.J., Moon, D.J., Kane, M.E., Obara, T., Ong, A.C., 2006. Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localisation of polycystin-2 in vivo and in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1465–1473. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl070>
- Tanokura, M., 1983. <sup>1</sup>H-NMR study on the tautomerism of the imidazole ring of histidine residues. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 742, 576–585. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(83\)90276-5](https://doi.org/10.1016/0167-4838(83)90276-5)
- Tian, Y., Kolb, R., Hong, J.-H., Carroll, J., Li, D., You, J., Bronson, R., Yaffe, M.B., Zhou, J., Benjamin, T., 2007. TAZ Promotes PC2 Degradation through a SCF $\beta$ -Trcp E3 Ligase Complex. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6383–6395. <https://doi.org/10.1128/MCB.00254-07>
- Torres, V.E., 2014. Strategies Targeting cAMP Signaling in the Treatment of Polycystic Kidney Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25, 18–32. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013040398>

- Torres, V.E., Harris, P.C., 2009. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. *Kidney Int.* 76, 149–168. <https://doi.org/10.1038/ki.2009.128>
- Tsiokas, L., 2009. Function and regulation of TRPP2 at the plasma membrane. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 297, F1–F9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.90277.2008>
- Tsiokas, L., Arnould, T., Zhu, C., Kim, E., Walz, G., Sukhatme, V.P., 1999. Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3934–3939.
- Tsiokas, L., Kim, S., Ong, E.-C., 2007. Cell biology of Polycystin-2. *Cell. Signal.* 19, 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.09.005>
- Venkatachalam, K., Montell, C., 2007. TRP Channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Vetter, I.R., Wittinghofer, A., 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299–1304. <https://doi.org/10.1126/science.1062023>
- Vögeli, B., 2014. The nuclear Overhauser effect from a quantitative perspective. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 78, 1–46. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2013.11.001>
- Wang, S., Zhang, J., Nauli, S.M., Li, X., Starremans, P.G., Luo, Y., Roberts, K.A., Zhou, J., 2007. Fibrocystin/Polyductin, Found in the Same Protein Complex with Polycystin-2, Regulates Calcium Responses in Kidney Epithelia. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3241–3252. <https://doi.org/10.1128/MCB.00072-07>
- Wanic-Kossowska, M., Posnik, B., Kobelski, M., Pawliczak, E., Pawlaczyk, K., Hoppe, K., Schwermer, K., Sikorska, D., 2014. The Polymorphism of the ACE Gene Affects Left Ventricular Hypertrophy and Causes Disturbances in Left Ventricular Systolic/Diastolic Function in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Sci. World J.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/707658>
- Ward, C.J., Turley, H., Ong, A.C., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., Ratcliffe, P.J., Gattner, K., Harris, P.C., 1996. Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1524–1528.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., Narumiya, S., 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 1, 136–143. <https://doi.org/10.1038/11056>
- Wierschem, C., 2013. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Kalziumbindungsdomäne des Kalziumkanals TRPP1 mit Hilfe der hochauflösenden NMR-Spektroskopie, Masterarbeit Universität Regensburg.
- Wilkes, M., Madej, M.G., Kreuter, L., Rhinow, D., Heinz, V., Sanctis, S.D., Ruppel, S., Richter, R.M., Joos, F., Grieben, M., Pike, A.C.W., Huiskonen, J.T., Carpenter, E.P., Kühlbrandt, W., Witzgall, R., Ziegler, C., 2017. Molecular insights into lipid-assisted Ca<sup>2+</sup> regulation of the TRP channel Polycystin-2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, nsmb.3357. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3357>
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L., Sykes, B.D., 1995. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* 6, 135–140.
- Wu, Y., Dai, X.-Q., Li, Q., Chen, C.X., Mai, W., Hussain, Z., Long, W., Montalbetti, N., Li, G., Glynn, R., Wang, S., Cantello, H.F., Wu, G., Chen, X.-Z., 2006. Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum. Mol. Genet.* 15, 3280–3292. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl404>
- Yao, G., Su, X., Nguyen, V., Roberts, K., Li, X., Takakura, A., Plomann, M., Zhou, J., 2014. Polycystin-1 regulates actin cytoskeleton organization and directional cell migration through a novel PC1-Pacsin 2-N-Wasp complex. *Hum. Mol. Genet.* ddt672. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt672>

- Yap, K.L., Ames, J.B., Swindells, M.B., Ikura, M., 1999. Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins* 37, 499–507.
- Ye, Q., Wang, H., Zheng, J., Wei, Q., Jia, Z., 2008. The complex structure of calmodulin bound to a calcineurin peptide. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 73, 19–27. <https://doi.org/10.1002/prot.22032>
- Yoder, B.K., Hou, X., Guay-Woodford, L.M., 2002. The Polycystic Kidney Disease Proteins, Polycystin-1, Polycystin-2, Polaris, and Cystin, Are Co-Localized in Renal Cilia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2508–2516. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000029587.47950.25>
- Yu, Y., Ulbrich, M.H., Li, M.-H., Buraei, Z., Chen, X.-Z., Ong, A.C.M., Tong, L., Isacoff, E.Y., Yang, J., 2009. Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11558–11563. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903684106>
- Zhang, Q., Taulman, P.D., Yoder, B.K., 2004. Cystic Kidney Diseases: All Roads Lead to the Cilium. *Physiology* 19, 225–230. <https://doi.org/10.1152/physiol.00003.2004>
- Zhang, Y., Tan, H., Jia, Z., Chen, G., 2008. Ligand-induced dimer formation of calmodulin. *J. Mol. Recognit. JMR* 21, 267–274. <https://doi.org/10.1002/jmr.895>
- Zhou, J., 2009. Polycystins and Primary Cilia: Primers for Cell Cycle Progression. *Annu. Rev. Physiol.* 71, 83–113. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100621>

## 6.4 Chemische Verschiebungen:

Hochdruckmessungen an PC2(717-792) Shifttabelle:

				Druck [MPa]																						
nuc	AS	res_ nr	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	220	240	250
HN	L	717	8,50	8,46	8,43	8,40	8,39	8,40	8,40	8,42	8,45	8,48														
N	L	717	124,55	124,36	124,20	124,11	124,07	124,10	124,17	124,30	124,49	124,72														
HN	K	718	8,26	8,22	8,19	8,17	8,16	8,16	8,17	8,19	8,22	8,25	8,30	8,35	8,42	8,49	8,58	8,67	8,78	8,89	9,01	9,14	9,29	9,59	9,94	10,13
N	K	718	122,67	122,45	122,26	122,10	122,00	121,95	121,93	121,97	122,04	122,17	122,34	122,55	122,81	123,12	123,46	123,85	124,30	124,77	125,28	125,86	126,45	127,82	129,33	130,11
HN	K	719	8,87	8,83																						
N	K	719	124,48	124,27																						
HN	N	720																								
N	N	720																								
HN	T	721																								
N	T	721																								
HN	V	722	7,79	7,76	7,71	7,68																				
N	V	722	121,29	121,10	120,93	120,77																				
HN	D	723	8,64	8,60	8,55	8,53																				
N	D	723	121,94	121,71	121,51	121,41																				
HN	D	724	8,46	8,40	8,37	8,35																				
N	D	724	122,75	122,51	122,33	122,16																				
HN	I	725	8,20	8,15	8,11	8,08	8,06	8,06	8,07	8,09	8,12	8,17	8,22	8,30	8,38	8,47	8,58	8,70	8,83	8,98	9,13	9,30	9,48	9,89	10,36	10,60
N	I	725	120,74	120,56	120,40	120,29	120,24	120,22	120,24	120,30	120,41	120,57	120,74	120,96	121,23	121,50	121,83	122,19	122,59	123,01	123,49	124,00	124,52	125,69	126,99	127,66
HN	S	726																								
N	S	726																								
HN	E	727	7,92	7,91	7,90	7,88	7,87	7,85	7,83	7,83	7,81	7,81														

N	E	727	121,38	121,16	120,96	120,78	120,64	120,54	120,46	120,42	120,44	120,44														
HN	S	728	8,04	8,00	7,96	7,93	7,93	7,93																		
N	S	728	117,59	117,32	117,05	116,85	116,70	116,57																		
HN	L	729	8,54	8,50	8,47																					
N	L	729	121,72	121,53	121,38																					
HN	R	730	8,00	7,96	7,92	7,88	7,85	7,83	7,81	7,79	7,78	7,77	7,78	7,79	7,80	7,85	7,86	7,88	7,91	7,94	7,97	8,01	8,05	8,16	8,27	8,33
N	R	730	120,61	120,38	120,18	120,02	119,91	119,86	119,84	119,89	119,97	120,12	120,31	120,55	120,85	121,26	121,65	122,11	122,58	123,11	123,71	124,35	125,03	126,52	128,20	129,09
HN	Q	731	8,11	8,07	8,04	8,01	7,99	7,97	7,95	7,94																
N	Q	731	119,16	118,97	118,81	118,71	118,65	118,68	118,76	118,74																
HN	G	732																								
N	G	732																								
HN	G	733																								
N	G	733																								
HN	G	734	8,69	8,67	8,65	8,63	8,61																			
N	G	734	107,27	106,98	106,73	106,52	106,36																			
HN	K	735	7,33	7,29	7,26	7,23	7,22	7,22	7,22	7,23																
N	K	735	118,45	118,23	118,04	117,88	117,78	117,75	117,74	117,78																
HN	L	736	8,25	8,21	8,18	8,16	8,15	8,14																		
N	L	736	120,06	119,90	119,77	119,72	119,72	119,78																		
HN	N	737	8,97	8,93	8,89	8,86	8,83	8,81																		
N	N	737	120,95	120,72	120,49	120,29	120,15	120,02																		
HN	F	738	8,40	8,36	8,34	8,32	8,31	8,33	8,36	8,40	8,44	8,50	8,58													
N	F	738	119,29	119,08	118,93	118,91	118,85	118,99	119,09	119,32	119,57	119,89	120,33													
HN	D	739	8,35	8,31	8,28	8,25	8,24	8,24	8,24	8,25	8,28	8,30	8,34	8,38	8,44	8,51	8,59	8,68	8,77	8,88	8,99	9,12				
N	D	739	118,50	118,31	118,16	118,05	118,00	118,04	118,11	118,21	118,40	118,58	118,72	119,05	119,38	119,81	120,28	120,75	121,32	121,91	122,54	123,27				
HN	E	740																								
N	E	740																								
HN	L	741	8,33	8,30	8,27	8,25																				
N	L	741	120,80	120,62	120,46	120,34																				

HN	R	742	8,98	8,94	8,91	8,87	8,85	8,82																			
N	R	742	119,26	119,03	118,82	118,66	118,56	118,51																			
HN	Q	743	7,67	7,64	7,60	7,56	7,54	7,51	7,49	7,47	7,46	7,45	7,46														
N	Q	743	116,64	116,43	116,24	116,10	116,01	115,96	115,98	116,02	116,10	116,27	116,47														
HN	D	744																									
N	D	744																									
HN	L	745	8,59	8,55	8,52	8,49	8,47	8,46	8,46																		
N	L	745	117,02	116,85	116,73	116,69	116,71	116,77	116,89																		
HN	K	746	8,81	8,76	8,72																						
N	K	746	123,30	123,05	122,83																						
HN	G	747																									
N	G	747																									
HN	K	748																									
N	K	748																									
HN	G	749	7,79	7,77	7,75	7,74	7,72	7,72	7,70	7,71																	
N	G	749	106,44	106,14	105,87	105,63	105,45	105,32	105,23	105,18																	
HN	H	750	7,66	7,62	7,59	7,56	7,54	7,54	7,55	7,57	7,59	7,63	7,67	7,72	7,79												
N	H	750	118,93	118,70	118,53	118,43	118,41	118,47	118,59	118,76	119,02	119,34	119,73	120,19	120,69												
HN	T	751	9,00	8,94	8,89	8,85	8,82	8,80	8,80	8,80																	
N	T	751	113,87	113,66	113,47	113,34	113,24	113,20	113,20	113,22																	
HN	D	752	8,82	8,78	8,74	8,72	8,71	8,71	8,71	8,72	8,74	8,78	8,82	8,88	8,94	9,00	9,08	9,17	9,27	9,38	9,49						
N	D	752	120,67	120,45	120,25	120,12	120,02	120,01	120,03	120,12	120,25	120,44	120,70	120,97	121,43	121,79	122,31	122,88	123,45	124,04	124,76						
HN	A	753	8,46	8,42	8,39	8,36	8,32																				
N	A	753	120,25	120,07	119,89	119,76	119,59																				
HN	E	754	7,78	7,77	7,75	7,73	7,72	7,71	7,70	7,69	7,68	7,67	7,67	7,66	7,66	7,65	7,65	7,65	7,66	7,65	7,65	7,65	7,65	7,64	7,64	7,63	7,62
N	E	754	120,03	119,83	119,65	119,50	119,37	119,31	119,24	119,22	119,23	119,27	119,34	119,45	119,58	119,75	119,95	120,18	120,45	120,73	121,07	121,42	121,83	122,72	123,74	124,26	
HN	I	755																									
N	I	755																									
HN	E	756	8,50	8,48	8,45	8,42	8,39	8,36																			

N	E	756	118,47	118,27	118,09	117,92	117,81	117,79																		
HN	A	757	7,66	7,62	7,58	7,54	7,51	7,47	7,44	7,42	7,41	7,39	7,38	7,37												
N	A	757	120,91	120,64	120,40	120,19	120,00	119,86	119,75	119,69	119,64	119,65	119,67	119,77												
HN	I	758	7,84	7,78	7,73	7,70																				
N	I	758	119,43	119,30	119,18	119,04																				
HN	F	759	8,50	8,45	8,41	8,38	8,37	8,38	8,41	8,41	8,45	8,50	8,57	8,65												
N	F	759	120,55	120,31	120,14	120,00	119,94	120,00	120,10	120,26	120,51	120,83	121,22	121,70												
HN	T	760	8,36	8,30	8,24	8,20																				
N	T	760	111,32	111,08	110,90	110,76																				
HN	K	761	7,40	7,36	7,33	7,31	7,30	7,30																		
N	K	761	119,59	119,38	119,21	119,07	118,99	118,97																		
HN	Y	762	7,80	7,75	7,71	7,68	7,67	7,67	7,68	7,73																
N	Y	762	112,23	112,01	111,87	111,84	111,88	112,04	112,27	112,57																
HN	D	763	7,91	7,87	7,84	7,81	7,79	7,78	7,78	7,79	7,80	7,83	7,87	7,91	7,97	8,04	8,12	8,20	8,30	8,41	8,52	8,65	8,78	9,08	9,41	9,59
N	D	763	121,11	120,89	120,69	120,54	120,43	120,38	120,39	120,42	120,51	120,68	120,90	121,15	121,46	121,86	122,28	122,77	123,31	123,90	124,51	125,20	125,94	127,57	129,42	130,38
HN	Q	764	7,91	7,88	7,85	7,82	7,79	7,76	7,74	7,72	7,70	7,68	7,67	7,66	7,66	7,66	7,67	7,67	7,68	7,70	7,71	7,73	7,76	7,82	7,89	7,92
N	Q	764	121,11	120,89	120,68	120,52	120,38	120,31	120,27	120,25	120,29	120,38	120,54	120,70	120,91	121,21	121,52	121,89	122,30	122,76	123,22	123,77	124,33	125,62	127,09	127,84
HN	D	765	8,07	8,02	8,00	7,95	7,96																			
N	D	765	114,36	114,14	113,95	113,79	113,74																			
HN	G	766	7,60	7,58	7,58	7,56	7,54																			
N	G	766	108,46	108,17	107,89	107,68	107,53																			
HN	D	767	8,06	8,01	7,98	7,94	7,92	7,91	7,91	7,92	7,92	7,95	8,00	8,05	8,10	8,18	8,26									
N	D	767	119,89	119,67	119,48	119,34	119,25	119,24	119,26	119,35	119,51	119,69	119,94	120,20	120,55	120,92	121,37									
HN	Q	768																								
N	Q	768																								
HN	E	769	7,97	7,94	7,91	7,87	7,85																			
N	E	769	117,94	117,74	117,54	117,41	117,28																			
HN	L	770	9,28	9,23	9,17																					
N	L	770	129,31	129,15	128,93																					

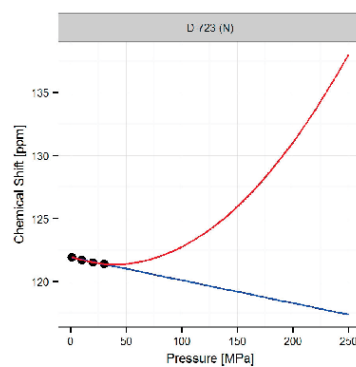
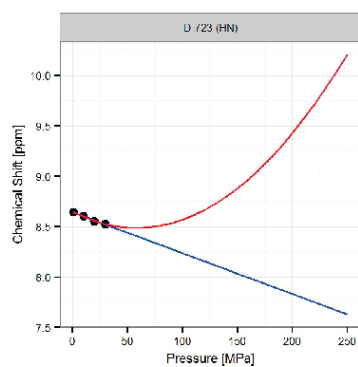
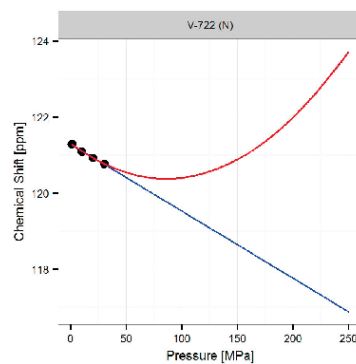
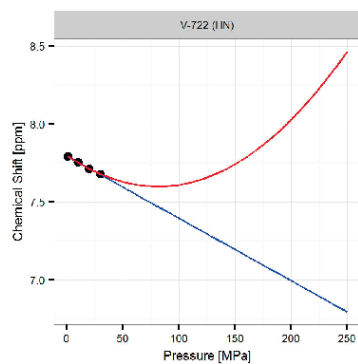
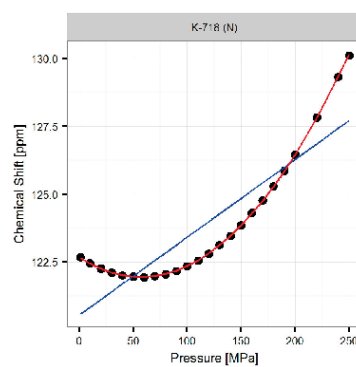
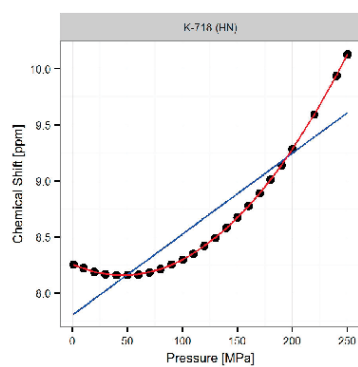
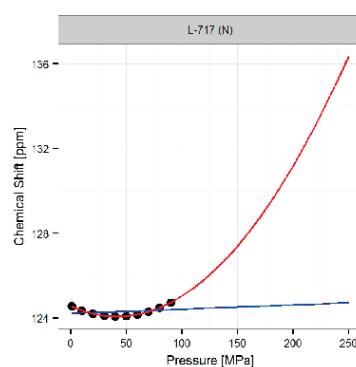
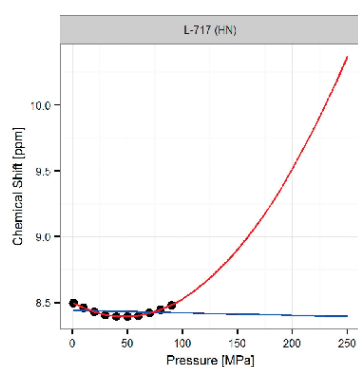


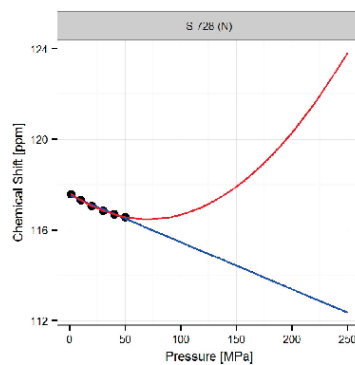
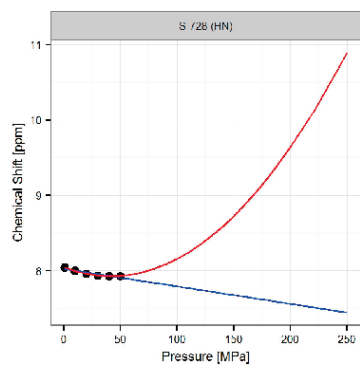
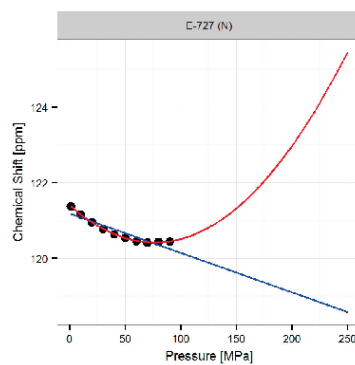
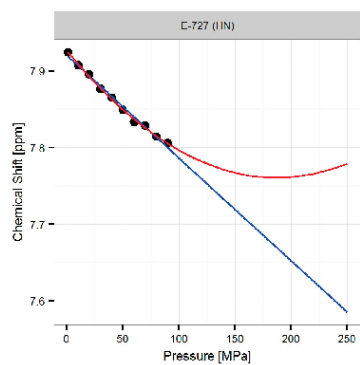
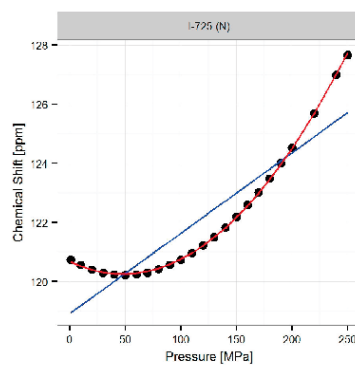
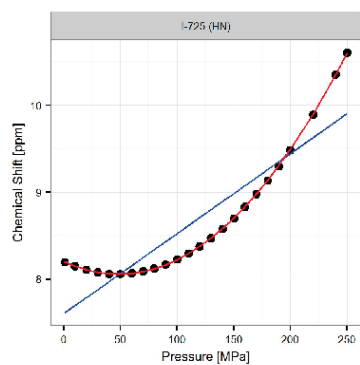
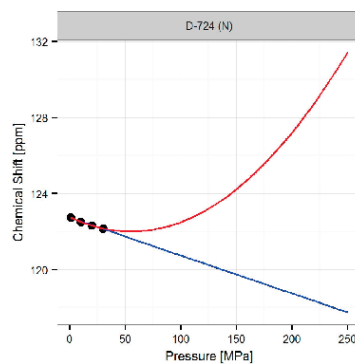
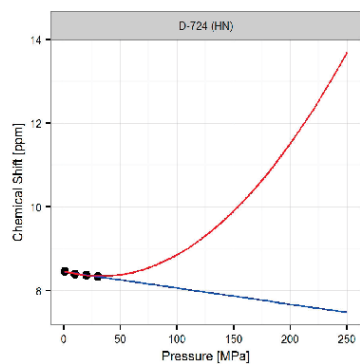
HN	T	771	8,50	8,44	8,39																				
N	T	771	114,06	113,80	113,56																				
HN	E	772																							
N	E	772																							
HN	H	773																							
N	H	773																							
HN	E	774	7,77	7,75	7,74	7,73	7,71	7,71	7,68	7,68															
N	E	774	120,89	120,69	120,48	120,31	120,19	120,11	120,06	120,00															
HN	H	775	8,76	8,72	8,69	8,67	8,66	8,65																	
N	H	775	119,78	119,55	119,35	119,23	119,16	119,23																	
HN	Q	776	8,13	8,09	8,06	8,02	7,99																		
N	Q	776	119,66	119,45	119,28	119,14	119,04																		
HN	Q	777	7,25	7,22																					
N	Q	777	116,65	116,40																					
HN	M	778	7,02	7,00	6,96	6,93	6,89																		
N	M	778	119,20	118,97	118,80	118,64	118,37																		
HN	R	779																							
N	R	779																							
HN	D	780																							
N	D	780																							
HN	D	781	8,30	8,25	8,21	8,18	8,17	8,16	8,17	8,18	8,21	8,22	8,26	8,32											
N	D	781	121,42	121,20	121,00	120,85	120,74	120,66	120,59	120,70	120,82	121,05	121,26	121,55											
HN	L	782	7,92	7,89	7,86	7,84	7,84	7,84	7,85	7,88	7,91	7,95													
N	L	782	121,38	121,18	121,04	120,94	120,89	120,92	121,00	121,13	121,35	121,58													
HN	E	783	7,82	7,80	7,77	7,76	7,73	7,72																	
N	E	783	118,41	118,20	118,04	117,89	117,79	117,73																	
HN	K	784	7,82	7,78	7,74	7,72	7,70	7,70																	
N	K	784	119,15	118,95	118,77	118,65	118,58	118,63																	
HN	E	785	7,97	7,94	7,93	7,91	7,89																		

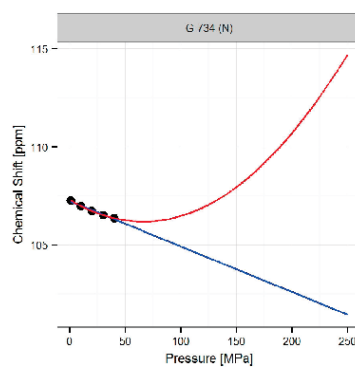
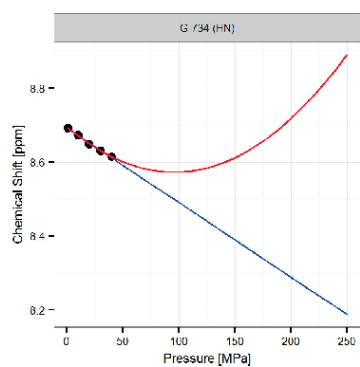
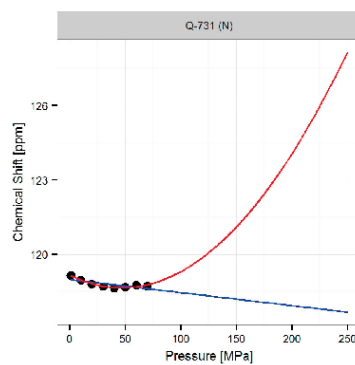
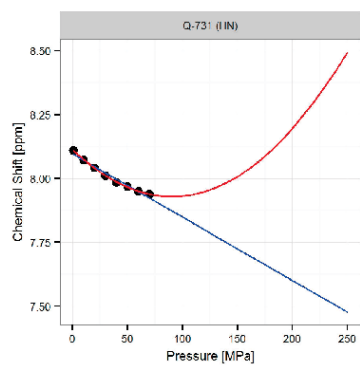
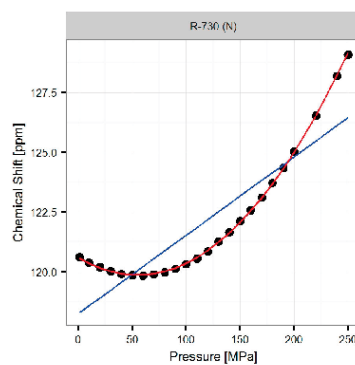
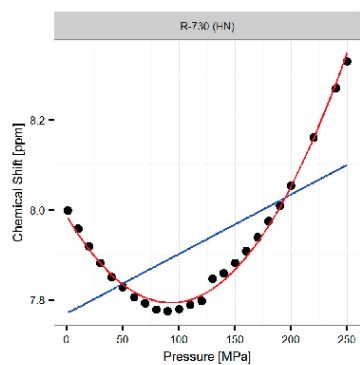
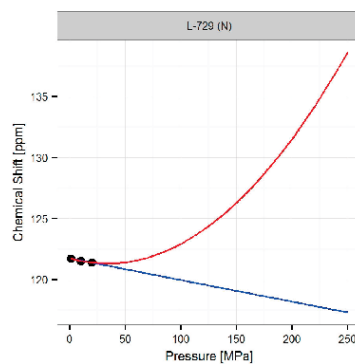
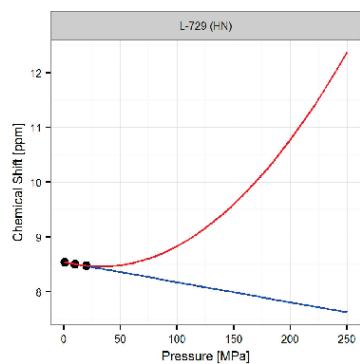
N	E	785	119,45	119,25	119,07	118,92	118,78																			
HN	R	786	7,96	7,92	7,88	7,85	7,82																			
N	R	786	120,40	120,19	120,01	119,88	119,80																			
HN	E	787	8,36	8,33	8,32	8,29	8,27	8,26	8,24	8,22	8,21	8,19	8,19	8,19	8,18	8,15	8,14	8,13	8,11	8,10	8,09	8,08	8,07	8,06	8,02	8,01
N	E	787	121,41	121,19	121,01	120,85	120,73	120,65	120,60	120,59	120,61	120,68	120,79	120,91	121,07	121,21	121,39	121,61	121,87	122,17	122,47	122,84	123,25	124,14	125,03	125,59
HN	D	788																								
N	D	788																								
HN	L	789	8,02	7,99	7,96	7,94	7,93	7,93	7,94	7,96	7,99	8,03	8,08	8,14	8,22	8,30	8,39	8,49	8,60	8,73	8,86	9,00	9,15	9,49	9,85	10,05
N	L	789	121,74	121,56	121,41	121,33	121,32	121,36	121,47	121,61	121,83	122,11	122,44	122,83	123,29	123,80	124,36	124,98	125,66	126,40	127,19	128,04	128,95	130,93	133,12	134,27
HN	D	790	8,27	8,23	8,19	8,17	8,15																			
N	D	790	120,40	120,17	119,98	119,84	119,74																			
HN	L	791	8,11	8,07	8,04	8,02	8,00	8,00	8,01	8,03	8,06	8,09	8,15	8,20	8,27	8,35	8,44	8,54	8,65	8,77	8,89	9,04	9,18	9,51	9,88	10,08
N	L	791	122,72	122,53	122,37	122,26	122,22	122,24	122,31	122,46	122,65	122,90	123,20	123,57	123,99	124,47	125,03	125,62	126,28	127,00	127,77	128,59	129,48	131,42	133,59	134,76
HN	D	792	7,95	7,91	7,87	7,85	7,83	7,83	7,83	7,84	7,87	7,90	7,94	7,99	8,05	8,12	8,20	8,29	8,39	8,50	8,61	8,74	8,88	9,19	9,53	9,71
N	D	792	126,31	126,09	125,89	125,76	125,66	125,62	125,62	125,68	125,79	125,96	126,17	126,44	126,75	127,12	127,54	128,00	128,52	129,10	129,73	130,39	131,12	132,74	134,55	135,51

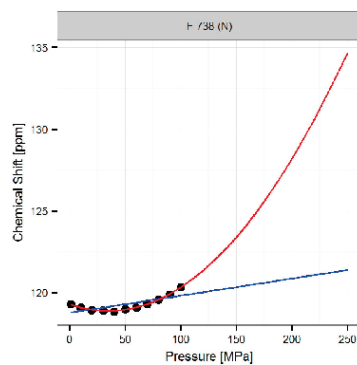
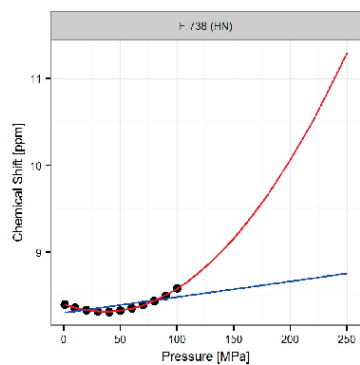
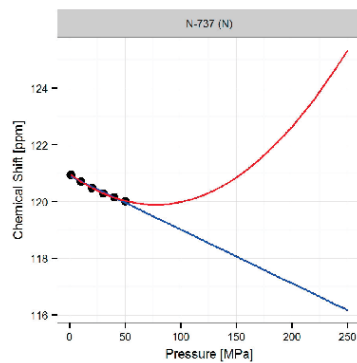
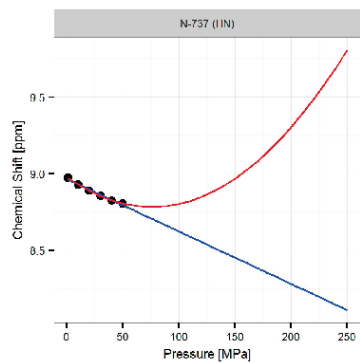
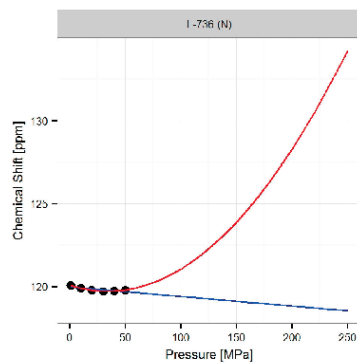
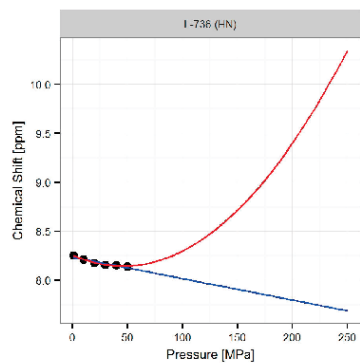
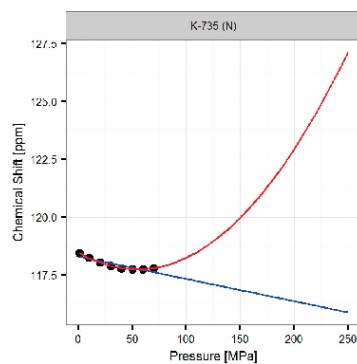
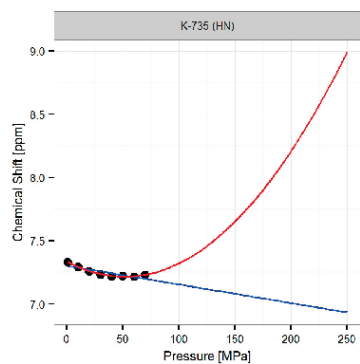
**Tabelle 45: Chemische Verschiebungen [ppm] der Aminosäuren von PC2(717-792) unter Hochdruck**

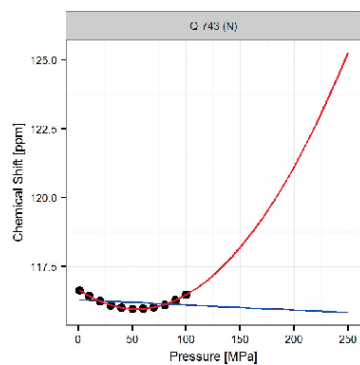
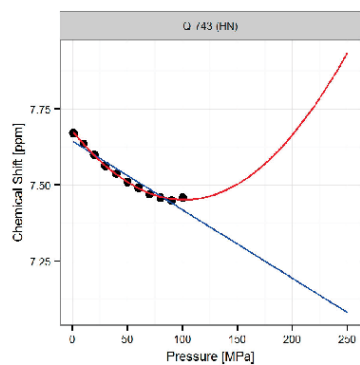
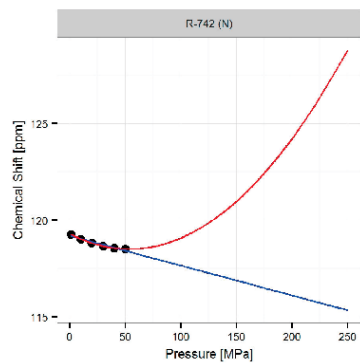
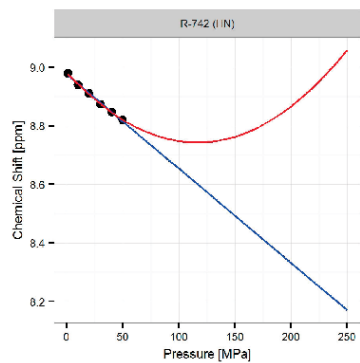
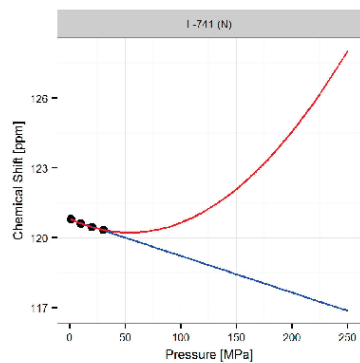
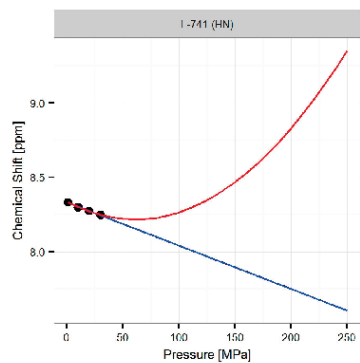
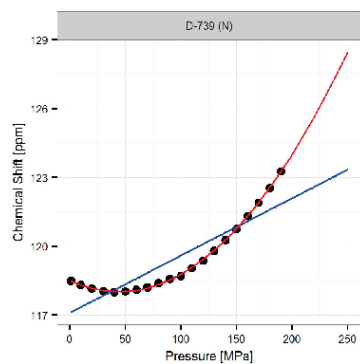
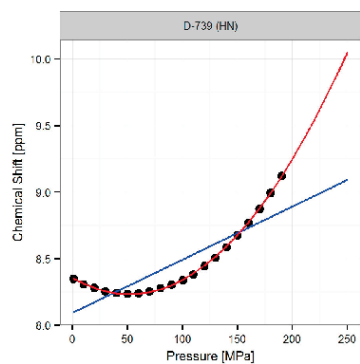
## Hochdruckmessungen an PC2(717-792) Shift Fits:

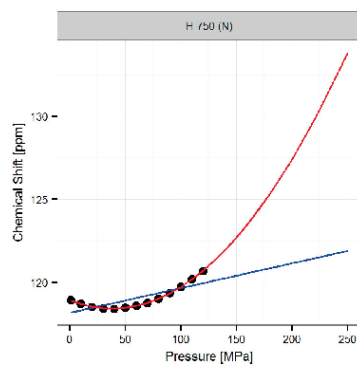
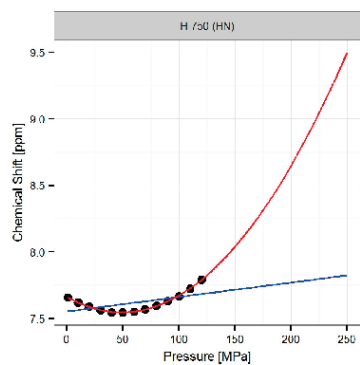
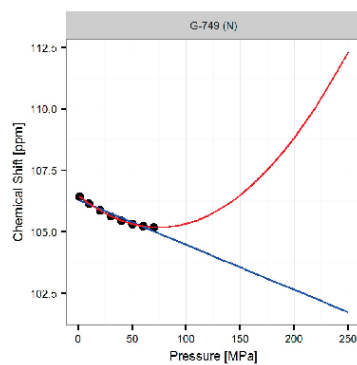
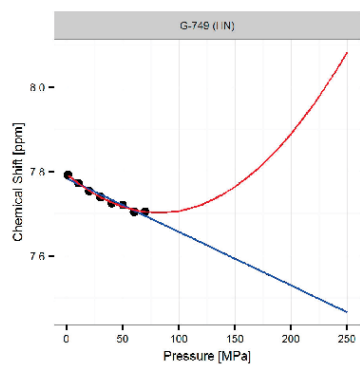
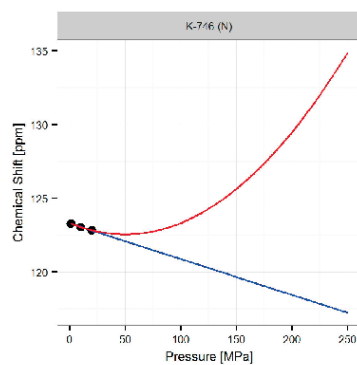
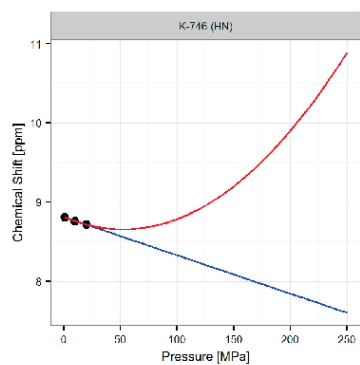
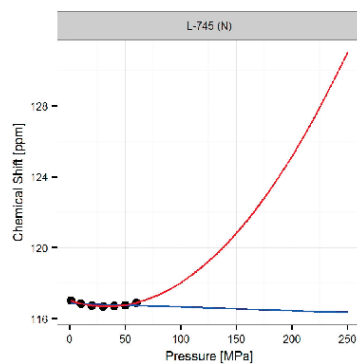
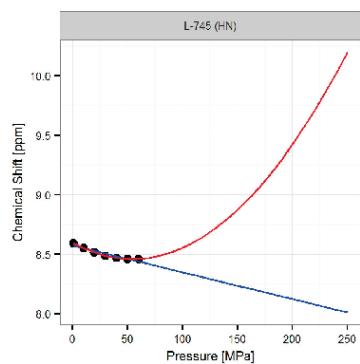




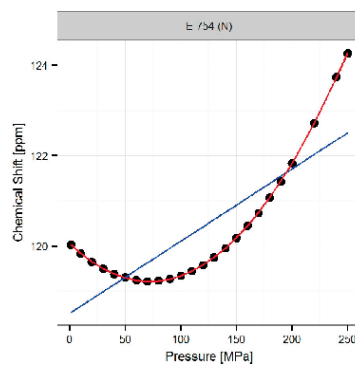
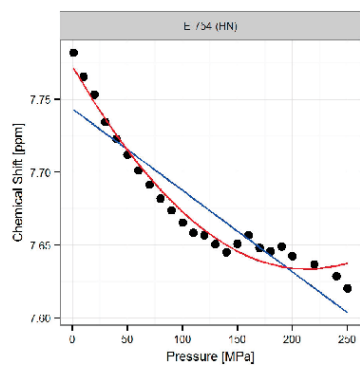
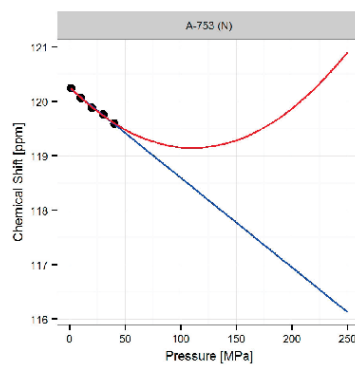
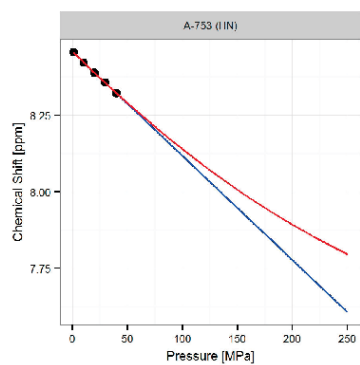
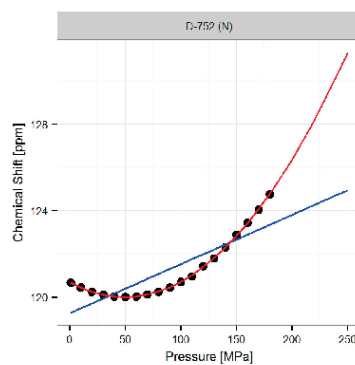
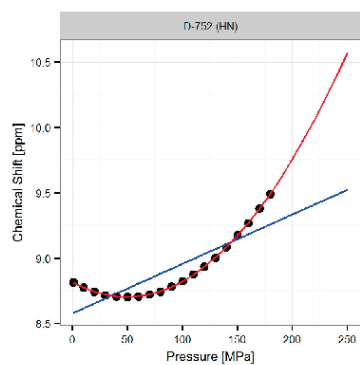
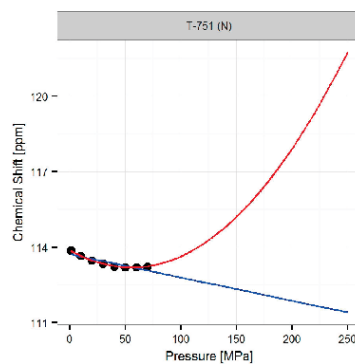
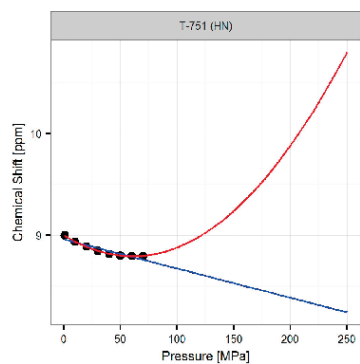


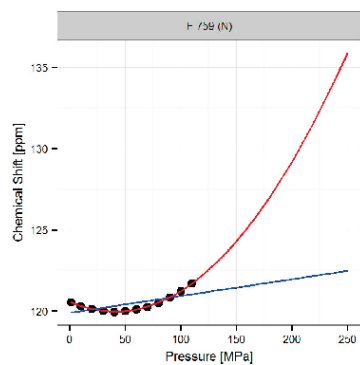
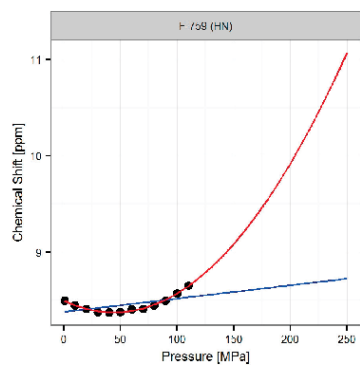
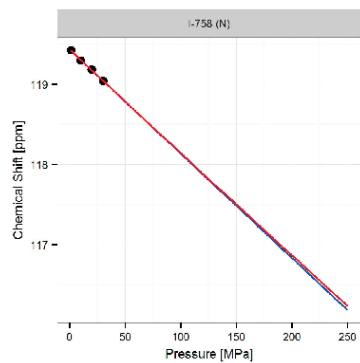
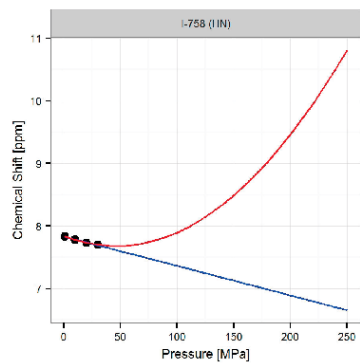
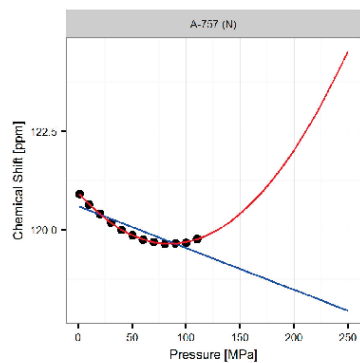
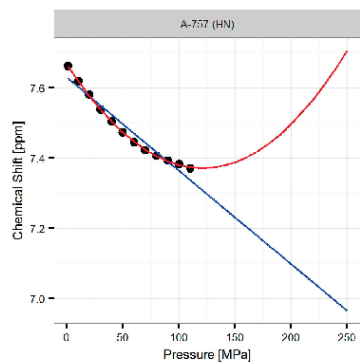
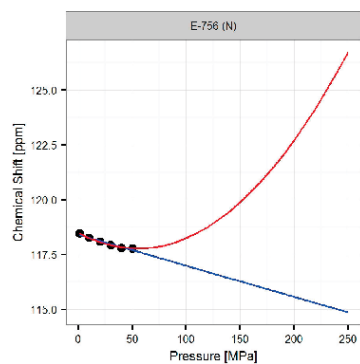
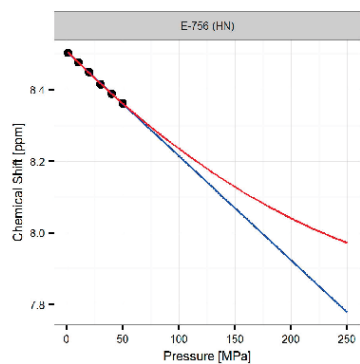


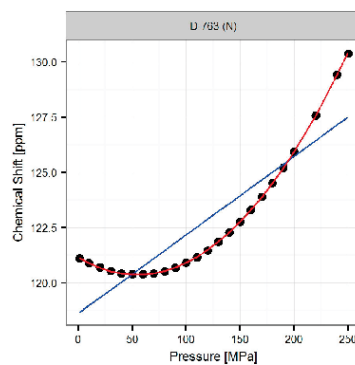
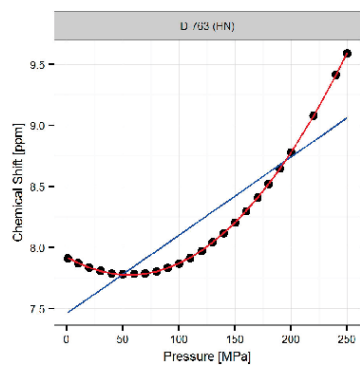
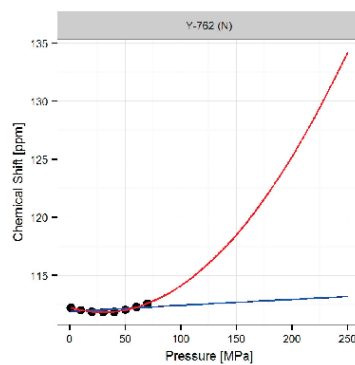
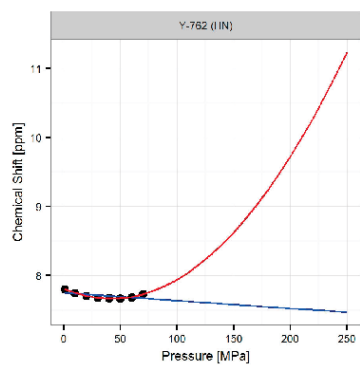
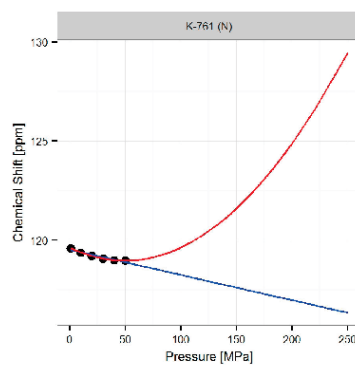
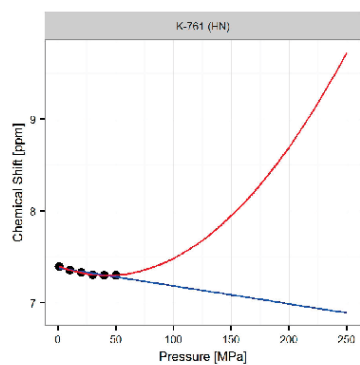
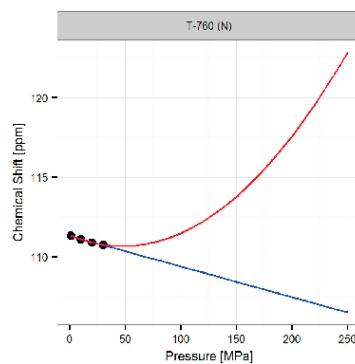
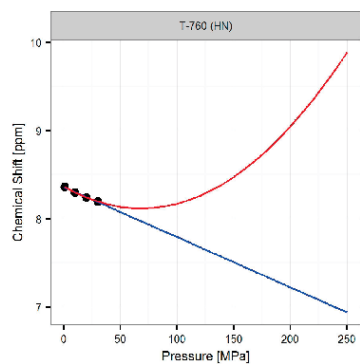


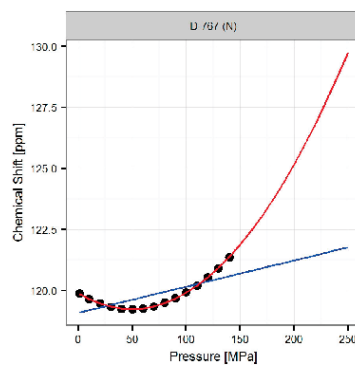
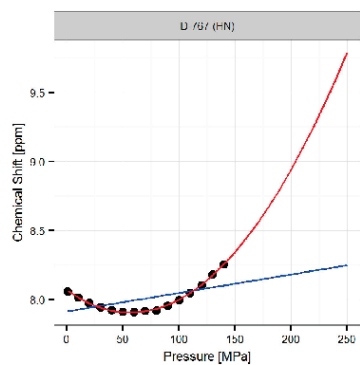
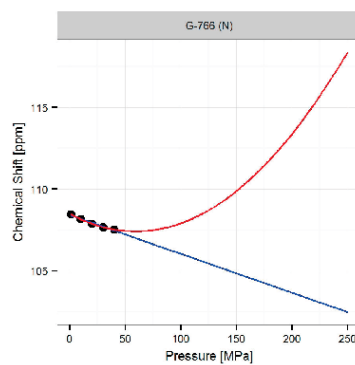
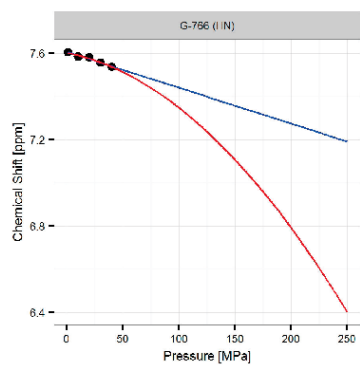
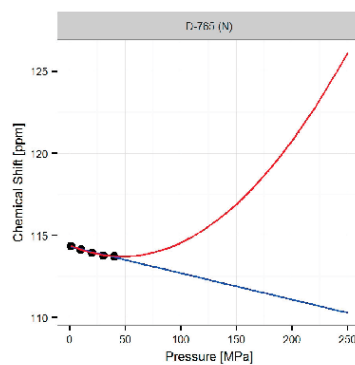
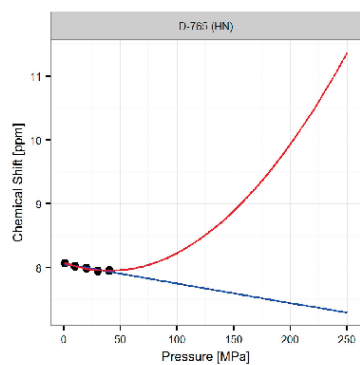
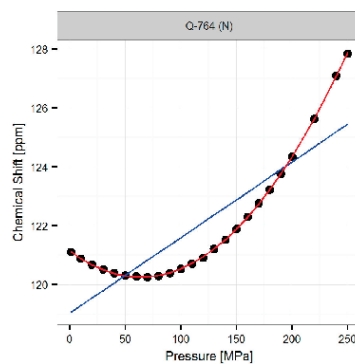
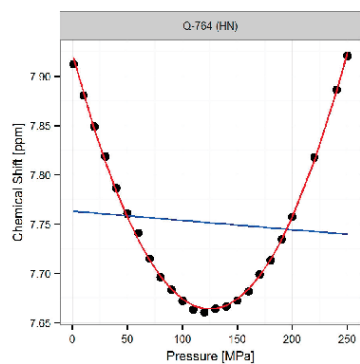


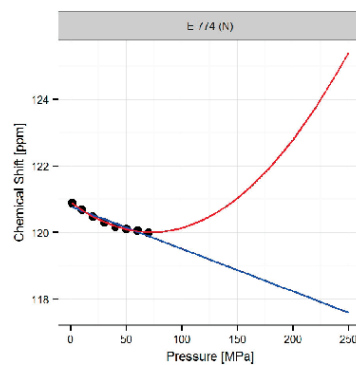
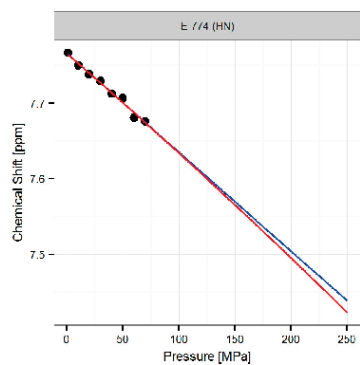
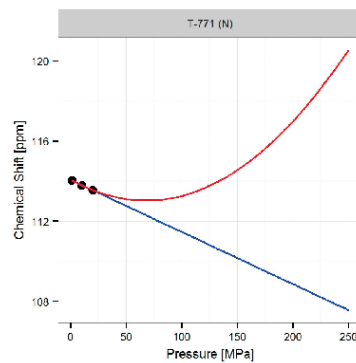
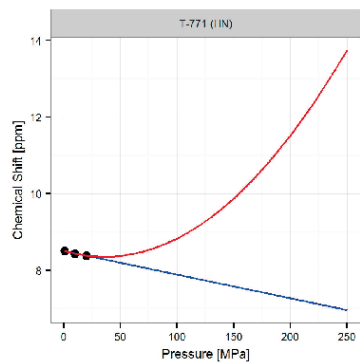
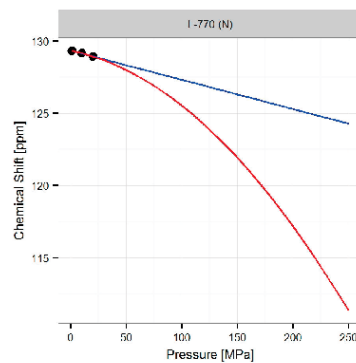
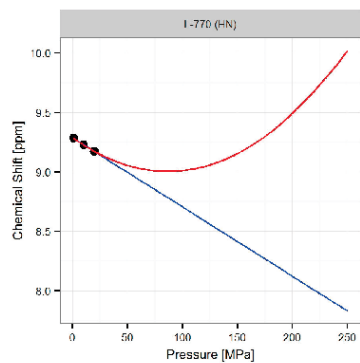
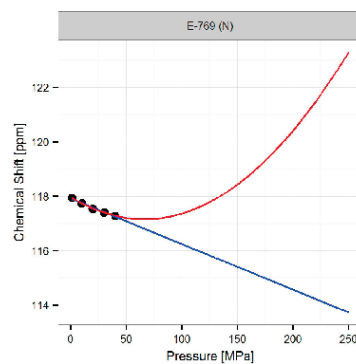
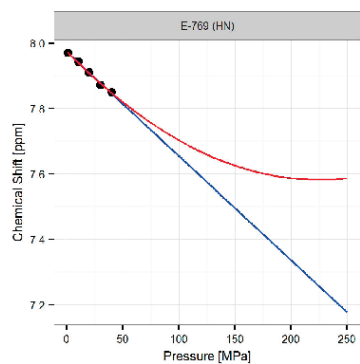


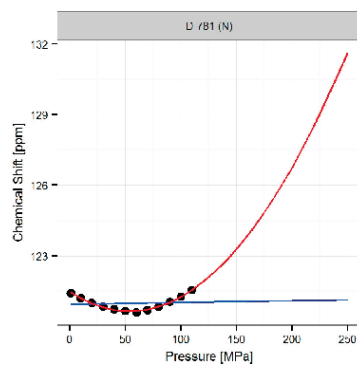
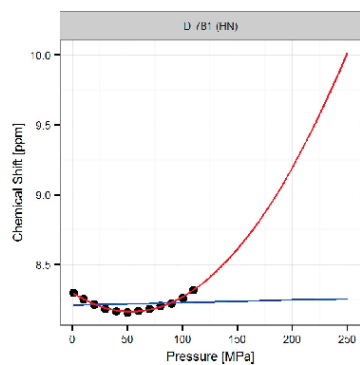
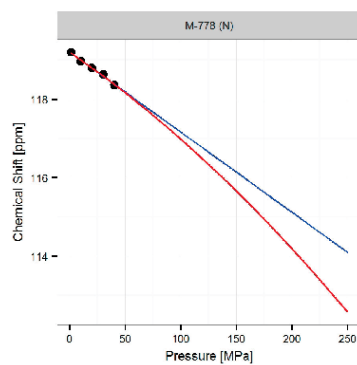
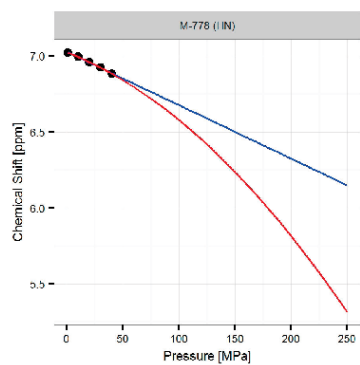
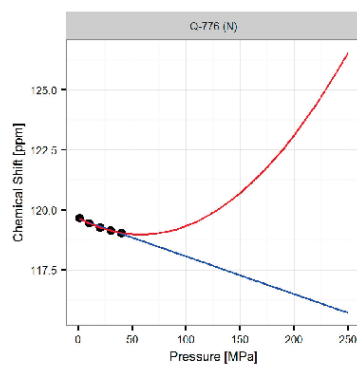
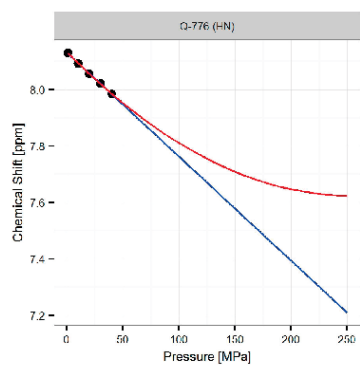
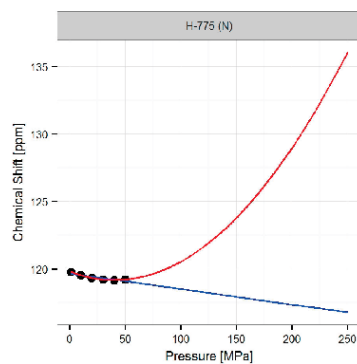
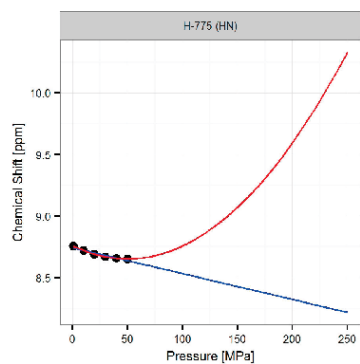


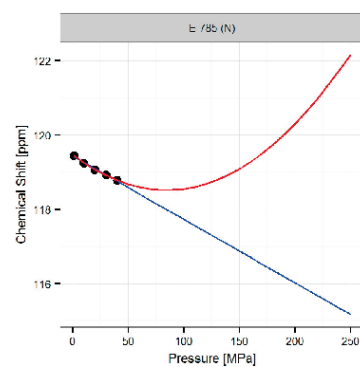
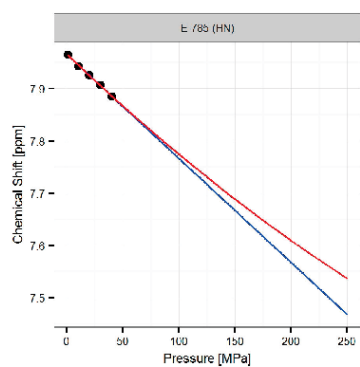
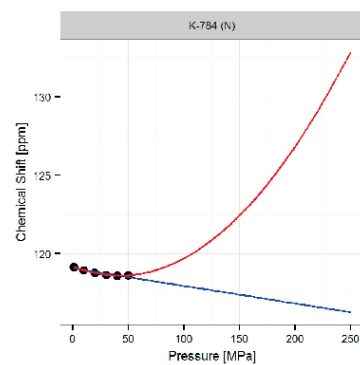
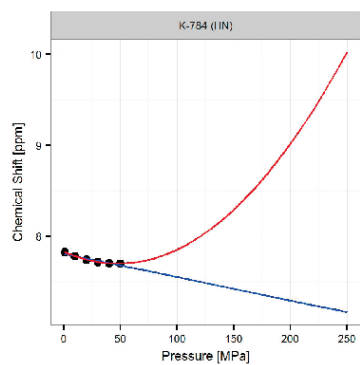
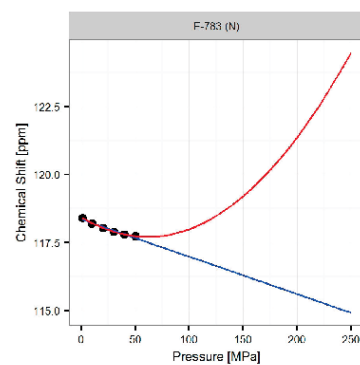
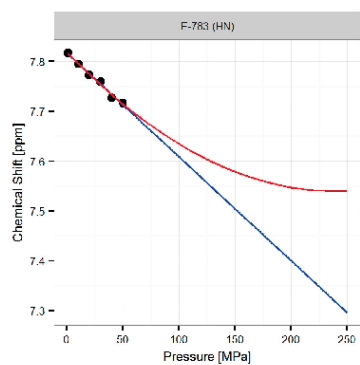
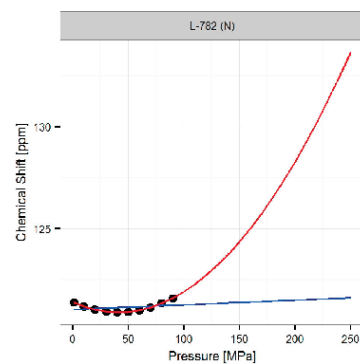
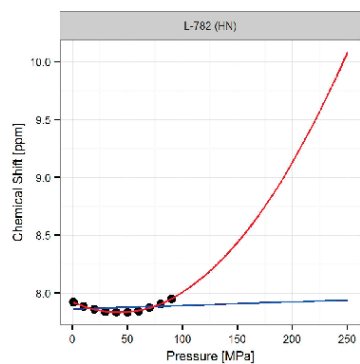


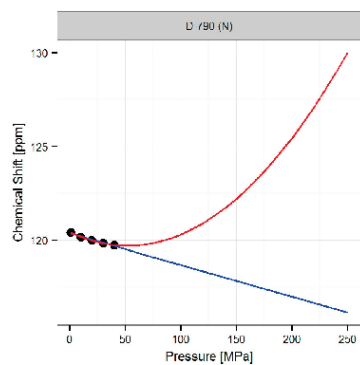
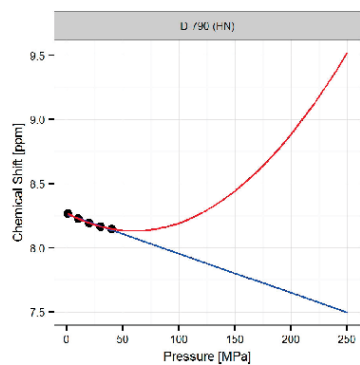
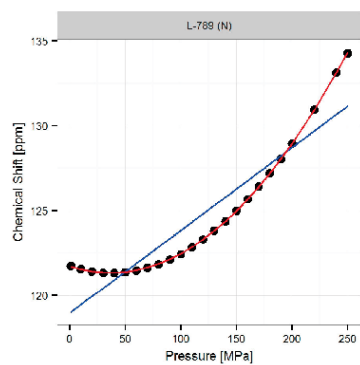
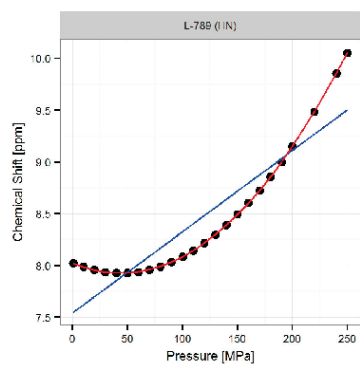
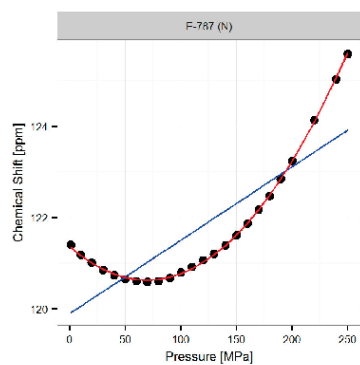
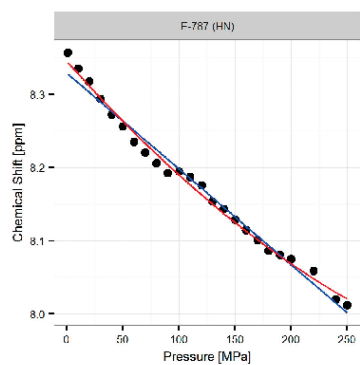
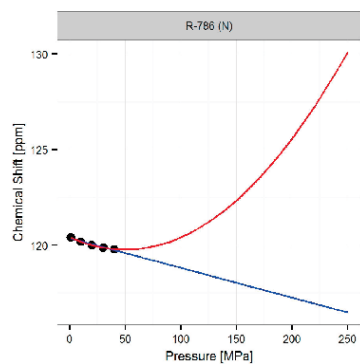
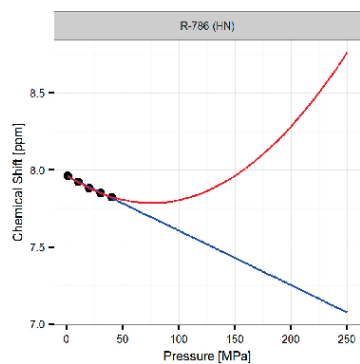




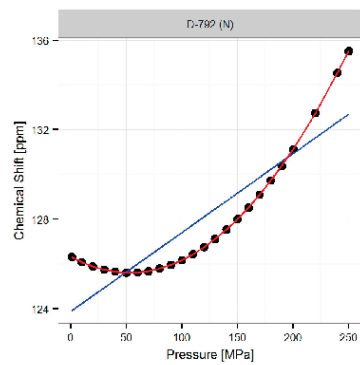
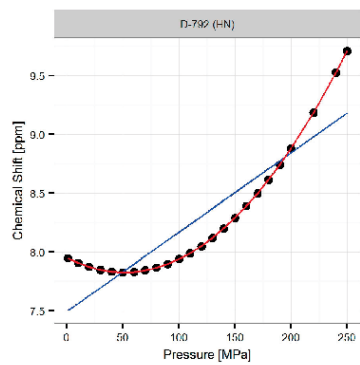
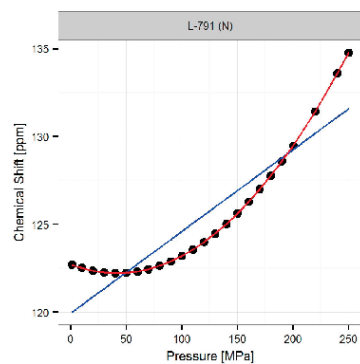
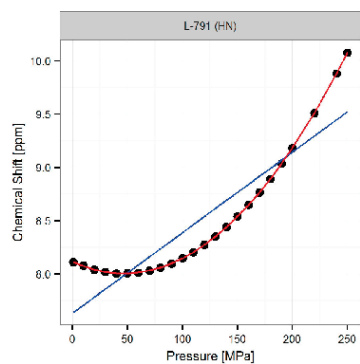












PC2(680-796) Titration mit mDia1(69-451):

res_nr	AS	60 $\mu$ M PC2(680-796)		60 $\mu$ M PC2(680-796) mit 300 $\mu$ M mDia1(69-451)	
		N	HN	N	HN
680	I	119,87	7,96	119,85	7,97
681	N	121,98	8,53	121,98	8,53
682	D	121,19	8,25	121,20	8,25
683	T	114,01	8,05	114,01	8,06
684	Y	122,62	8,21	122,60	8,21
685	S	117,78	8,03	117,76	8,03
686	E	123,30	8,35	123,29	8,35
687	V	121,94	8,16	121,92	8,16
688	K	125,75	8,42	125,71	8,41
689	S	117,39	8,34	117,39	8,34
690	D	122,87	8,44	122,88	8,45
691	L	122,33	8,14	122,31	8,14
692	A	123,23	8,17	123,23	8,17
693	Q	119,03	8,16	119,03	8,17
694	Q	120,78	8,24	120,78	8,24
695	K	121,92	8,26	121,92	8,26
696	A	124,16	8,12	124,13	8,11
697	E				
698	M	120,41	8,19	120,44	8,19
699	E	121,37	8,34	121,39	8,35
700	L	122,19	8,19	122,18	8,19
701	S	114,90	8,20	114,93	8,21
702	D				
703	L	120,55	7,93	120,55	7,93
704	I				
705	R				
706	K				
707	G	109,14	8,46	109,15	8,46
708	Y				
709	H				
710	K				
711	A				
712	L				
713	V				
714	K				
715	L				
716	K				
717	L				
718	K				
719	K				
720	N				

721	T				
722	V				
723	D				
724	D				
725	I	122,03	7,99	121,96	7,98
726	S				
727	E				
728	S	116,00	8,22	115,96	8,22
729	L	118,34	8,32	118,33	8,32
730	R	120,63	8,00	120,63	8,01
731	Q	118,99	8,08	119,01	8,08
732	G	105,82	7,79	105,86	7,80
733	G	106,68	7,65	106,70	7,66
734	G	107,11	8,73	107,13	8,72
735	K	117,48	7,26	117,47	7,26
736	L	120,06	8,27	120,12	8,28
737	N	120,88	9,00	120,87	9,00
738	F	118,34	8,32	118,33	8,32
739	D	117,74	7,39	117,78	7,40
740	E	119,40	6,95	119,42	6,95
741	L	120,84	8,37	120,84	8,37
742	R	119,24	8,98	119,23	8,98
743	Q	116,76	7,69	116,74	7,70
744	D	120,00	7,75	119,99	7,75
745	L	116,90	8,60	116,92	8,60
746	K	122,07	8,80	122,02	8,79
747	G	108,52	8,16	108,47	8,17
748	K	118,36	7,31	118,37	7,32
749	G	106,54	7,80	106,52	7,81
750	H	118,56	7,70	118,64	7,69
751	T	113,83	8,98	113,85	8,99
752	D	120,80	8,81	120,83	8,82
753	A	120,06	8,44	120,10	8,45
754	E	119,94	7,82	119,95	7,81
755	I	118,77	8,06	118,78	8,08
756	E	118,03	8,56	118,07	8,56
757	A	121,57	7,72	121,57	7,73
758	I	119,71	7,96	119,62	7,96
759	F	120,39	8,51	120,38	8,51
760	T	111,66	8,40	111,69	8,41
761	K	119,34	7,49	119,36	7,50
762	Y	112,13	7,82	112,13	7,83
763	D	121,16	7,95	121,12	7,94
764	Q	125,78	7,90	125,79	7,90
765	D	114,32	8,06	114,32	8,06

766	G	108,48	7,60	108,48	7,61
767	D	119,96	8,08	119,96	8,09
768	Q	115,47	10,05	115,46	10,06
769	E	118,07	7,99	118,09	8,00
770	L	129,77	9,31	129,77	9,31
771	T	114,05	8,47	114,05	8,47
772	E	120,06	8,27	120,12	8,28
773	H	118,03	8,56	118,07	8,56
774	E	120,94	7,79	120,93	7,79
775	H	120,04	8,75	120,01	8,75
776	Q	119,12	8,00	119,11	8,00
777	Q	116,41	7,19	116,41	7,20
778	M	120,08	8,15	120,05	8,17
779	R				
780	D				
781	D	121,37	8,49	121,35	8,49
782	L	121,76	7,89	121,73	7,89
783	E	118,34	7,78	118,37	7,79
784	K				
785	E				
786	R				
787	E				
788	D				
789	L				
790	D	123,13	8,54	123,15	8,53
791	L	121,96	8,04	121,96	8,04
792	D	120,06	8,27	120,12	8,28
793	H	119,38	8,29	119,36	8,29
794	S	116,82	8,35	116,78	8,35
795	S				
796	L	129,46	7,85	129,44	7,84

**Tabelle 46: Chemische Verschiebungen [ppm] der Aminosäuren von PC2(680-796) für 60  $\mu$ M PC2(680-796) ohne und mit 300  $\mu$ M mDia1(69-451) in der Probe**

	Chemische Verschiebung $\delta$ [ppm]	
AS	N	HN
Y684/B	122,52	8,24
E686/B	122,99	8,35
A692/B	123,54	8,18
E699/B	121,64	8,36
L700/B	122,19	8,24
L703/B	120,43	7,92
R730/B	120,49	7,97
F738/B	119,08	8,39
Q743/B	116,47	7,69
Y762/B	111,85	7,86
D763/B	121,00	7,95
D767/B	119,81	8,09
L791/B	121,96	8,04
H793/B	119,54	8,32
L796/B	129,30	7,82

Tabelle 47: Chemische Verschiebungen der identifizierten zweiten Zustände von PC2(680-796) ohne mDia1 in der Probe

	Population	
Aminosäure	Zustand A	Zustand B
Y684	0,85	0,15
E686	0,79	0,21
A692	0,88	0,12
E699	0,74	0,26
L700	0,77	0,23
L703	0,60	0,40
R730	0,69	0,31
F738	0,64	0,36
Q743	0,65	0,35
Y762	0,75	0,25
D763	0,69	0,31
D767	0,62	0,38
L791	0,54	0,46
H793	0,91	0,09
L796	0,61	0,39

Tabelle 48: Populationsverhältnisse bei Aminosäuren mit identifizierten zweiten Zuständen von PC2(680-796)

PC2(717-792) Titration mit mDia1(69-451):

		60 $\mu$ M PC2(717-792)		60 $\mu$ M PC2(717-792) mit 300 $\mu$ M mDia1(69-451)	
res_nr	AS	N	HN	N	HN
717	L	124,52	8,48	124,50	8,48
718	K	122,68	8,26	122,68	8,26
719	K	124,51	8,87	124,39	8,89
720	N				
721	T				
722	V	121,26	7,82	121,21	7,83
723	D	122,04	8,61	122,03	8,60
724	D	122,72	8,46	122,78	8,46
725	I	120,79	8,20	120,80	8,20
726	S				
727	E	121,28	7,93	121,25	7,93
728	S	117,49	8,05	117,48	8,06
729	L	121,84	8,52	121,86	8,53
730	R	120,63	8,00	120,63	8,00
731	Q	119,19	8,12	119,20	8,13
732	G				
733	G				
734	G	107,35	8,68	107,37	8,67
735	K	118,48	7,35	118,50	7,36
736	L	120,05	8,23	120,04	8,23
737	N	120,96	8,97	120,98	8,97
738	F	119,42	8,43	119,46	8,43
739	D	118,46	8,33	118,46	8,33
740	E				
741	L	120,69	8,35	120,71	8,34
742	R	119,24	8,95	119,22	8,94
743	Q	116,65	7,67	116,62	7,68
744	D				
745	L	117,06	8,58	117,07	8,57
746	K	123,27	8,79	123,27	8,79
747	G				
748	K				
749	G	106,45	7,80	106,45	7,80
750	H	119,05	7,64	119,14	7,64
751	T	113,89	8,99	113,93	9,00
752	D	120,77	8,83	120,78	8,84
753	A	120,38	8,46	120,39	8,46
754	E	120,03	7,78	120,00	7,79
755	I				
756	E	118,60	8,50	118,66	8,50
757	A	121,00	7,68	121,02	7,69

758	I	119,50	7,88	119,53	7,87
759	F	120,53	8,50	120,51	8,50
760	T	111,37	8,37	111,39	8,38
761	K	119,67	7,43	119,69	7,43
762	Y	112,23	7,80	112,23	7,80
763	D	121,12	7,92	121,14	7,92
764	Q	121,12	7,92	121,14	7,92
765	D	114,46	8,09	114,48	8,09
766	G	108,50	7,61	108,50	7,62
767	D	119,93	8,07	119,94	8,07
768	Q				
769	E	117,99	7,99	118,01	8,00
770	L	129,32	9,30	129,28	9,34
771	T	114,20	8,52	114,12	8,54
772	E				
773	H				
774	E	120,90	7,75	120,90	7,75
775	H	119,71	8,75	119,69	8,75
776	Q	119,52	8,13	119,59	8,14
777	Q	116,78	7,29	116,74	7,28
778	M	119,24	7,03	119,32	7,03
779	R				
780	D				
781	D	121,32	8,27	121,31	8,27
782	L	121,28	7,93	121,25	7,93
783	E	118,50	7,84	118,54	7,85
784	K	119,34	7,84	119,36	7,84
785	E	119,54	7,99	119,55	7,99
786	R	120,34	7,97	120,35	7,97
787	E	121,39	8,34	121,39	8,34
788	D				
789	L	121,76	8,02	121,76	8,02
790	D	120,63	8,29	120,65	8,30
791	L	122,74	8,11	122,74	8,11
792	D	126,32	7,95	126,31	7,95

**Tabelle 49: Chemische Verschiebungen [ppm] der Aminosäuren von PC2(717-792) bei 60  $\mu$ M PC2(717-792) ohne und mit 300  $\mu$ M mDia1(69-451) in der Probe**

## **7 Danksagung**

Ich möchte mich recht herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt und betreut haben:

Großen Dank an Hans Robert für die Betreuung der Arbeit und die Unterstützung bei Fragen!!!

Vielen Dank auch an den Prüfungsausschuss Prof. Dr. Christine Ziegler, Prof. Dr. Wolfram Gronwald und Prof. Dr. Gernot Längst!

Danke an alle Mitarbeiter des Lehrstuhls Kalbitzer, im Besonderen:

Prof. Dr. Claudia Munte, für die Hilfestellung bei den Hochdruck-NMR-Messungen,

Sabine Laberer für die Hilfestellung bei Fragen im biochemischen Bereich,

Dr. Gudrun Horn für die Betreuung in der Anfangszeit der Arbeit,

Dr. Michael Spörner für fachliche Hilfestellung sowie gemeinsame Mittagessen,

und meine Laborkollegen Dr. Hannes Hiltl und Dr. Malte Andrasch für ihre Unterstützung.

Zum Schluss ein großer Dank an meine Familie und meine Freundin Julia, die mich während der gesamten Arbeit unterstützt haben.



## **8 Eidesstattliche Erklärung**

### **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation selbstständig von mir angefertigt und alle genutzten Hilfsmittel von mir angegeben wurden. Ich erkläre, dass die wörtlich oder dem Sinn nach anderer Veröffentlichungen entnommenen Stellen von mir gekennzeichnet wurden.

---

Markus Landgraf

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner weiteren Doktorprüfung unterzogen habe und diese Dissertation in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung an keiner weiteren Fakultät eingereicht wurde.

---

Markus Landgraf